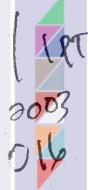


sdh scan  
2/7/9



## KARAKTERISASI PROTEASE *Bacillus megaterium*

### DSM 319 SEBAGAI AGENSIA PELEPAS RAMBUT

@Hak cipta milik IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :

- Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
- Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

**SKRIPSI**  
**ALDI SADANA**



**PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL TERNAK**

**JURUSAN ILMU PRODUKSI TERNAK**

**FAKULTAS PETERNAKAN**

**INSTITUT PERTANIAN BOGOR**

**2003**

**IPB University**



## RINGKASAN

ALDI SADANA. 2002. Karakterisasi Protease *Bacillus megaterium* DSM 319 sebagai Agensia Pelepas Rambut. Skripsi. Program Studi Teknologi Hasil Ternak, Jurusan Ilmu Produksi Ternak, Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor.

Pembimbing Utama	: Ir. Mohamad Yamin M.Agr.Sc.
Pembimbing Anggota I	: Dr. Ir. Rarah Ratih A. M. DEA.
Pembimbing Anggota II	: Dr. Ir. Budiasih Wahyuntari MSc.

Industri penyamakan kulit merupakan industri yang menyediakan kulit. Penyamakan kulit dilakukan dalam tahapan-tahapan, namun beberapa tahapan berdampak buruk atau negatif terhadap lingkungan. Tahap *liming* atau pengapur dan *bating* atau pelunakan paling mengkontribusikan polusi terbanyak. Polusi yang dihasilkan berupa natrium disulfida ( $\text{Na}_2\text{S}$ ) yang menyebabkan bau tidak enak (Brady *et al.*, 1990), menimbulkan korosi, menyebabkan kenaikan nilai kandungan BOD (Biochemical Oxygen Demand) dan COD (Chemical Oxygen Demand) serta atau dan berdampak negatif terhadap kesehatan para pekerja. Masalah ini dapat diatasi dengan mengurangi pemakaian dari  $\text{Na}_2\text{S}$  atau mensubstitusi dengan protease.

Tujuan dari penelitian ini adalah mempelajari karakter dari protease yang dihasilkan dari *Bacillus megaterium* DSM 319. Karakterisasi dilakukan terhadap protease tersebut untuk memudahkan penggunaannya sebagai perontok rambut atau bulu pada industri penyamakan kulit. Karakter yang diamati adalah suhu dan pH optimum dari aktivitas protease, jenis protease yang ditentukan melalui aktivitasnya terhadap keberadaan penghambat atau inhibitor protease, aktivitas protease terhadap beberapa protein, perkiraan berat molekul protease dan aplikasi protease pada kulit. Protease ini diharapkan dapat memenuhi kebutuhan protease dalam negeri.

Protease *Bacillus megaterium* DSM 319 yang dikarakterisasi, diproduksi dalam media lokal, molases. Aktivitas protease diamati dengan metode Walter yang dimodifikasi (Wahyuntari, 2001), sedangkan kadar protein protease diukur dengan metode Bradford (1976). Jenis protease diketahui dengan menguji protease dengan senyawa penghambat protease logam, EDTA dan senyawa penghambat protease serina dan sistein, PMSF, kemudian pengujian terhadap ion-ion divalent.

Pengujian substrat protein dilakukan untuk mengetahui jenis protein yang dapat dihidrolisis oleh protease *Bacillus megaterium* DSM 319 yang ditentukan dengan melakukan *running* protein yang belum dan telah direaksikan oleh protease *Bacillus megaterium* DSM 319 pada SDS PAGE (Bollag dan Edelstein, 1991). Perkiraan berat molekul protease ini dilakukan dengan metode zimogram (Freidrich dan Antranikian, 1996) dengan substrat kasein.

Protease *Bacillus megaterium* DSM 319 mempunyai aktivitas optimum pada suhu 30 °C (dengan kisaran 30-45 °C) dan pH 8 (dengan kisaran pH 6-8). Aktivitas protease dihambat secara keseluruhan oleh EDTA dan sebagian oleh PMSF. Aktivitas protease meningkat dengan adanya ion  $\text{Ca}^{2+}$ . Protein-protein yang terhidrolisis adalah kasein, kolagen, albumin (BSA), hemoglobin dan gelatin. Berat molekul dari protease *Bacillus megaterium* DSM 319 diperkirakan sebesar 67,31 kD.

Kata kunci: Protease, *Bacillus megaterium* DSM 319, pelepas bulu, karakterisasi.



## SUMMARY

ALDI SADANA. 2002. **Characterization of *Bacillus megaterium* DSM 319 Proteases as A Depilation Agent.** Script. Study Program of Animal Product Technology, Departement of Animal Product Technology, Faculty of Animal Science, Bogor Agricultural University.

Advisor : Ir. Mohamad Yamin M.Agr.Sc.  
Co-Advisor I : Dr. Ir. Rarah Ratih A. M. DEA.  
Co-Advisor II : Dr. Ir. Budiasih Wahyuntari MSc.

Leather tanning industry is an industry which provides leather. Leather tanning was done in stages, however some stages had a negative impact to the environment. Liming and bating stages mostly contributes pollutions. Pollutants, which produced are sodium disulfide ( $\text{Na}_2\text{S}$ ), they responsible for bad odor (Brady *et al.*, 1990), corrosion, increased the value of BOD (Biochemical Oxygen Demand) and COD (Chemical Oxygen Demand), had a negative impact to the worker. These problems could be solved by reducing the use of  $\text{Na}_2\text{S}$  or substituted with proteases.

The aim of this experiment is to study the character of proteases which produced from *Bacillus megaterium* DSM 319. Protease characterization was held to make easy application as a depilation agent in leather tanning industry. Character, which had been observed were temperature and pH for optimal activity, proteases classified by reacted the protease with proteases inhibitor, proteases activity to several protein, estimated proteases molecular weight and protease to leather application. This proteases were expected to provide local country demand.

*Bacillus megaterium* DSM 319 proteases were produced in local media, molasses. Proteases activities were held by Modified Walter Method (Budiasih Wahyuntari, 2001), whereas protein quantities was measured by Bradford method (1976). Proteases type had been recognised by tested proteases with metalloprotease inhibitor, EDTA and serine and cysteine, PMSF it proceeded with divalent ions reaction.

Protein test were done to find hydrolysed protein by *Bacillus megaterium* DSM 319 proteases. The test were done by running protein and protein which were hydrolysed with *Bacillus megaterium* DSM 319 proteases in SDS PAGE. SDS PAGE using Bollag and Edelstein (1991). Protease molecular weight estimated through zymogram method. *Bacillus megaterium* DSM 319 proteases with casein as substrate.

*Bacillus megaterium* DSM 319 proteases had optimum activities at 30 °C and pH 8. Proteases activities are total inhibited by EDTA but, slightly inhibited by PMSF. Proteases activities were activated by ion  $\text{Ca}^{2+}$ . Hydrolysed protein were casein, collagen, albumin (BSA), haemoglobin and gelatin. Molecular weight of proteases *Bacillus megaterium* DSM 319 was 67,31 kD.

Keywords: Protease, *Bacillus megaterium* DSM 319, depilation agent, Characterization



## KARAKTERISASI PROTEASE *Bacillus megaterium* DSM 319

### SEBAGAI AGENSIA PELEPAS RAMBUT

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang  
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :

- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Oleh

**Aldi Sadana**

**D.04497078**

Skripsi ini merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar

**Sarjana Peternakan** pada fakultas Peternakan

Institut Pertanian Bogor

**PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL TERNAK**

**JURUSAN ILMU PRODUKSI TERNAK**

**FAKULTAS PETERNAKAN**

**INSTITUT PERTANIAN BOGOR**

**2003**



**KARAKTERISASI PROTEASE *Bacillus megaterium* DSM 319  
SEBAGAI AGENSIA PELEPAS RAMBUT**

Oleh

**ALDI SADANA**

**D.04497078**

**Skripsi ini telah disetujui dan disidangkan di hadapan  
Komisi Ujian Lisan pada tanggal 24 Desember 2002**

**Pembimbing Utama**

**Ir. M Yamin M.Agr.Sc.**

**Pembimbing Anggota**

**Dr. Ir. Rarah Ratih A.M. DEA**

**Pembimbing Anggota**

**Dr. Ir. B. Wahyuntari M.Sc.**

**Ketua Jurusan Ilmu Produksi Ternak**

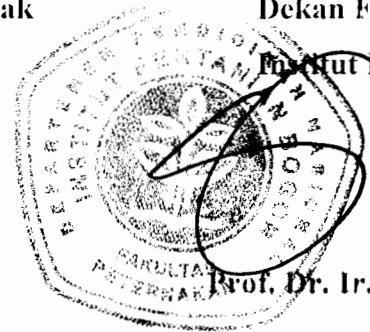
**Fakultas Peternakan**

**Institut Pertanian Bogor**

**Dr. Ir. Rarah Ratih A.M. DEA**

**Dekan Fakultas Peternakan**

**Institut Pertanian Bogor**



**Prof. Dr. Ir. Soedarmadi, M.Sc**



## **RIWAYAT HIDUP**

Penulis dilahirkan pada tanggal 19 Oktober 1977 di Bogor, Jawa Barat. Penulis adalah anak pertama dari dua bersaudara dari pasangan Bapak Antoni dan Ibu Susianah.

Pendidikan dasar diselesaikan pada tahun 1991 di SD Regina Pacis Bogor, pendidikan lanjutan menengah pertama diselesaikan pada tahun 1994 di SMP Regina Pacis dan pendidikan lanjutan menengah atas diselesaikan pada tahun 1997 di SMU Regina Pacis Bogor.

Pada tahun 1997, Penulis masuk IPB melalui Ujian Masuk Perguruan Tinggi Negeri (UMPTN). Pada tahun 1998, Penulis terdaftar sebagai mahasiswa Program Studi Teknologi Hasil Ternak, Jurusan Ilmu Produksi Ternak, Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor.

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:  
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah  
b. Pengutipan titik merugikan kepentingan yang wajar IPB University.

## PRAKATA

Puji syukur Penulis panjatkan ke Hadirat Tuhan Yesus atas segala rahmat dan anugerahNya sehingga penelitian dan skripsi ini dapat diselesaikan.

Pada kesempatan ini Penulis mengucapkan terima kasih kepada Ir. Mohamad Yamin, M.Agr.Sc. sebagai dosen Pembimbing Utama, Dr. Ir. Rarah Ratih M.A. DEA dan Dr. Ir. Budiasih Wahyuntari MSc. sebagai Pembimbing Anggota atas segala bimbingan selama penelitian hingga penulisan skripsi.

Ucapan terima kasih juga Penulis sampaikan kepada Ibu Trismillah sebagai Kepala Laboratorium Bioindustri Badan Penelitian dan Pengembangan Teknologi (BPPT), Serpong, yang telah memberikan kesempatan, fasilitas dan bantuan kepada Penulis selama penelitian, kepada Mas Mufti yang telah banyak membantu selama penelitian di laboratorium dalam menuntun cara-cara pemakaian alat-alat laboratorium kemudian kepada Bapak Deden, Mas Jamil, Bapak Lutfi, Mbak Iim dan Mbak Ani. Mbak Hendra sebagai rekan selama penelitian yang banyak membantu selama penelitian baik secara praktek maupun teori serta dukungan dan banyak hal yang tidak dapat disebutkan disini. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada papa, mama dan Daniel atas dukungan doa dan kasih sayangnya setiap saat.

Ucapan terima kasih juga diberikan kepada teman-teman di laboratorium Marita, Helen, Widy, Yani, Yuli, Yasser dan untuk Mas Heri dan Gigiz atas pinjaman kameranya. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Cen Li dan Novri untuk dukungannya serta Dina, Dian dan Risty untuk persahabatannya, serta pihak-pihak yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu.

Semoga karya ilmiah ini dapat bermanfaat bagi orang yang membacanya.



## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>RINGKASAN.....</b>	ii
<b>SUMMARY.....</b>	iii
<b>RIWAYAT HIDUP.....</b>	iv
<b>PRAKATA.....</b>	v
<b>DAFTAR ISI.....</b>	vi
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	vii
<b>DAFTAR LAMPIRAN.....</b>	viii
<b>PENDAHULUAN.....</b>	1
Latar Belakang.....	1
Tujuan Penelitian.....	2
Manfaat.....	2
<b>TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	3
Enzim.....	3
Klasifikasi Protease.....	4
Penyamakan Kulit.....	6
Penggunaan Enzim dalam Proses Pelepasan Rambut.....	8
Mekanisme Pelepasan Rambut.....	9
<b>MATERI DAN METODE PENELITIAN.....</b>	10
Waktu dan Tempat.....	10
Bahan dan Alat.....	10
Bahan.....	10
Alat.....	11
Metode.....	11
Produksi dan Pemekatan Enzim.....	12
Penentuan Kadar Protein (Bradford, 1984).....	12
Pengukuran Aktivitas Protease Menurut Metode Walter (1988) yang Dimodifikasi (Wahyuntari, 2001).....	12
Penentuan pH dan Suhu Optimum Aktivitas Protease.....	14
Pengaruh Penghambat EDTA dan PMSF.....	15
Pengujian Protease <i>Bacillus megaterium</i> DSM 319 terhadap Berbagai Substrat dengan Metode Elektroforesis.....	16

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang  
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

- Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
- Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.



Pengaruh Deterjen terhadap Aktivitas Enzim.....	16
Penentuan Berat Molekul Protease dengan Zimogram.....	17
<b>HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>19</b>
Produksi dan Pemekatan Protease <i>Bacillus megaterium</i> DSM 319.....	19
Penentuan pH Optimum dari Aktivitas Protease <i>Bacillus megaterium</i> DSM 319.....	19
Penentuan Suhu Optimum Aktivitas Protease <i>Bacillus megaterium</i> DSM 319.....	20
Pengaruh Inhibitor EDTA dan PMSF terhadap Aktivitas Protease dari <i>Bacillus megaterium</i> DSM 319.....	22
Pengaruh Ion Divalen.....	23
Pengujian Substrat.....	24
Pengaruh Senyawa Pereduksi dan Deterjen.....	26
Penentuan Berat Molekul denganZimogram.....	27
Aplikasi Protease pada Kulit.....	28
<b>KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>	<b>29</b>
Kesimpulan.....	29
Saran.....	29
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>30</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>34</b>

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang  
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah  
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



## **DAFTAR TABEL**

Nomor		Halaman
1.	Klasifikasi Protease.....	5
2.	Tahapan Pengujian Aktivitas Protease dengan Metode Walter (1984) .....	13
3.	Metode Walter (1988) yang dimodifikasi (Wahyuntari, 2001) .....	14
4.	Komposisi Bahan-bahan untuk Zimogram .....	17

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1.

Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a.

Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah

b.

Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



## DAFTAR GAMBAR

Nomor	Halaman
1. Proses Penyamakan Kulit .....	7
2. Kurva pH Optimum dari Aktivitas Enzim Protease .....	19
3. Kurva Suhu Optimum dari Aktivitas Enzim Protease .....	21
4. Aktivitas Protease <i>Bacillus megaterium</i> DSM 319 terhadap EDTA pada Konsentrasi yang Berbeda.....	22
5. Aktivitas Protease <i>Bacillus megaterium</i> DSM 319 terhadap PMSF pada Konsentrasi yang Berbeda .....	22
6. Aktivitas Protease <i>Bacillus megaterium</i> DSM 319 dengan Penambahan CaCl <sub>2</sub> pada Berbagai Konsentrasi.....	23
7. Aktivitas Protease <i>Bacillus megaterium</i> DSM 319 dengan Penambahan Ion-ion Divalen selain Kalsium .....	24
8. Aktivitas Protease terhadap Berbagai Jenis Protein.....	25
9. Aktivitas Protease <i>Bacillus megaterium</i> DSM 319 dengan Penambahan (a) SDS 0,1% dan (b) SDS 0,4% pada Konsentrasi yang Berbeda.....	26
10. Penentuan Berat Molekul Protease <i>Bacillus megaterium</i> DSM 319 pada Substrat Kasein dengan Metode Zimogram .....	27
11. Aplikasi Protease <i>Bacillus megaterium</i> DSM 319 sebagai Agensia Pelepas Rambut (a) Kulit Sebelum Perlakuan dan (b) Kulit yang Setelah Perlakuan.....	28

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :

  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.



## **DAFTAR LAMPIRAN**

Nomor ..

Halaman

1. Bahan-bahan untuk Aktivitas Enzim Metode Walter (1988) yang Dimodifikasi (Wahyuntari, 2001).....	34
2. Kurva Standar Bradford.....	35
3. Persamaan dari Marker Zimogram .....	35
4. Bahan-bahan untuk SDS-PAGE .....	36

*Hak cipta milik IPB University*

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

## PENDAHULUAN

### Latar Belakang

Industri penyamakan kulit adalah industri yang membuat kulit mentah menjadi kulit samak yang lebih awet dan tahan lama, sehingga mudah untuk penggunaannya sebagai bahan sandang. Industri ini bergerak dalam pemenuhan kebutuhan masyarakat akan bahan kulit. Penyamakan adalah usaha untuk membuat kulit seperti keadaan aslinya yaitu dalam keadaan hidup. Kulit yang dihasilkan beragam bentuknya sesuai dengan kebutuhan dan tujuan akhir dari industri pengolahan kulit. Kulit yang dihasilkan dapat dengan atau tanpa rambut. Pada industri jaket kulit, kulit diharapkan tanpa rambut sama sekali, sebaliknya pada industri selendang rambut, rambut pada kulit tetap dipertahankan.

Proses pelepasan rambut lebih dikenal sebagai *liming* atau proses pengapur, proses ini menggunakan natrium disulfida ( $\text{Na}_2\text{S}$ ) dan  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ . Karyadi *et al.* (1996) menyatakan kalau *unhairing* atau proses pelepasan rambut dan *liming* adalah salah satu tahapan proses yang menyebabkan pencemaran lingkungan. Limbah yang dihasilkan dalam bentuk padat berupa hancuran-hancuran rambut, sedangkan limbah cair mengandung sulfida serta bubuk kapur. Limbah sulfida ini merupakan zat beracun disertai bau yang tidak menyenangkan, terlebih pada tahap pembuangan menimbulkan korosi dan akumulasinya dapat menyebabkan gas beracun (Malathi dan Chakraborty, 1991). Salah satu alternatif yang dapat disarankan untuk menghindari dihasilkannya limbah sulfida, pada proses tersebut (*liming* dan *unhairing*) dilakukan secara enzimatis. Enzim merupakan salah satu agensia dengan nilai polusi yang lebih rendah, dan biasanya digunakan protease.

Protease merupakan satu dari tiga jenis enzim yang diperdagangkan pada tingkat dunia dengan dominasi sebesar 60% (Rao *et al.*, 1998), dan sedikitnya 50% enzim ini digunakan sebagai bahan pembantu industri (Puwanakrishnan dan Dhar, 1988). Protease dapat diproduksi dari hewan, tumbuhan, mikroba dan serangga tertentu (Anwar dan Saleemuddin, 1998).

Penerapan enzim ini pada industri penyamakan kulit, telah lama dilakukan, terutama dalam *bating* atau proses pelunakan, menggunakan enzim yang berasal dari pankreas sapi, domba atau babi (Stanley, 1994). Penelitian awal penggunaan pada



proses pelunakan kulit dilakukan oleh Röhm pada tahun 1910 (Puvanakrishnan dan Dhar, 1988). Keuntungan protease pada hasil akhir kulit yaitu kekuatan daya tarik yang baik, *stitch tear strength* atau kekuatan robek jahitan, kelenturan dan daya ulur yang baik. Selain itu, rambut dilepaskan dalam keadaan utuh sehingga dapat digunakan untuk keperluan lain (Malathi dan Chakraborty, 1991).

Protease yang banyak digunakan saat ini mempunyai merek dagang oropon, tetapi bahan ini masih diimpor. Permintaan pasar akan kulit yang semakin meningkat membuat kebutuhan enzim menjadi tinggi pula, sehingga pengeluaran negara untuk mendapatkannya menjadi besar. Cara mengatasi masalah ini adalah dengan cara memproduksi enzim secara lokal.

Waltam (1997) telah berhasil memproduksi protease mikroba dengan menggunakan bakteri *Bacillus megaterium* DSM 319 dalam optimasi media lokal, seperti molases, namun belum mendapatkan karakter dari protease tersebut. Oleh karena itu, karakterisasi protease *Bacillus megaterium* DSM 319 sebagai agensia pelepas rambut pada proses penyamakan kulit sangat menarik untuk dipelajari, untuk itu penelitian ini dilakukan.

### Tujuan Penelitian

Penelitian ini dilakukan untuk mempelajari karakter dari protease yang dihasilkan *Bacillus megaterium* DSM 319, sehingga akan memudahkan penggunaanya sebagai agensia dalam pengolahan kulit, serta dapat digunakan secara maksimal. Karakter yang diamati adalah suhu dan pH optimal aktivitas enzim, jenis protease, aktivitas protease terhadap beberapa protein dan perkiraan berat molekul dari enzim.

### Manfaat

Penelitian ini diharapkan terutama dapat memberikan informasi tentang karakter protease, yang dihasilkan oleh *Bacillus megaterium* DSM 319 sehingga dapat memudahkan penggunaanya. Selanjutnya, protease yang berasal dari *Bacillus megaterium* DSM 319 diharapkan dapat menggantikan protease impor yang masih banyak digunakan oleh industri penyamakan kulit, karena produksi protease dengan media lokal akan menurunkan biaya produksinya dan harga jual enzim menjadi lebih murah.



## TINJAUAN PUSTAKA

### Enzim

Enzim adalah suatu protein yang bertindak sebagai katalisator reaksi biologis atau disebut juga sebagai biokatalisator (Muchtadi *et al.*, 1992). Suatu katalisator akan mempercepat suatu reaksi kimia. Enzim adalah sebuah katalisator reaksi kimia yang spesifik terhadap substrat tertentu untuk menghasilkan suatu produk atau produk-produk tertentu (Hudiyono, 1998).

Lehninger (1982) menyatakan bahwa enzim merupakan unit fungsional dalam metabolisme sel. Enzim bekerja secara berurutan dan teratur, mengkatalisis ratusan reaksi secara bertahap. Reaksi-reaksi tersebut meliputi penguraian molekul nutrien, menyimpan dan mengubah energi kimiawi serta membuat makro molekul sel dari prekursor sederhana. Pada dasarnya, semua reaksi biokimia tubuh dikatalis oleh enzim (Rodwell, 1981).

Enzim pada awalnya dimanfaatkan hanya untuk membuat produk-produk pangan seperti pembuatan arak dari nira, asinan dari kol cina, keju, tape singkong, ketan, roti, kue ape dan brein. Para gembala membawa susu pada penampung yang berasal dari lambung anak sapi sehingga terbentuk dadih atau keju. Kegiatan-kegiatan ini hanya dilakukan dalam skala rumah, atau industri kecil. Pemanfaatan enzim pada skala industri baru dilakukan pada tahun 1960-an, sejak itu ilmu enzim berkembang secara pesat (Winarno, 1995).

Saat ini, protease merupakan enzim yang paling penting dan memiliki nilai ekonomi yang tinggi. Perdagangan protease merupakan satu dari tiga kelompok besar enzim industri. Tiga kelompok besar enzim industri adalah protease, amilase dan lipase. Penjualan protease mencapai 60% dari total penjualan enzim dunia (Rao *et al.*, 1998). Beberapa protease seperti rennet, yang disebut juga kimosin, diperoleh dari perut keempat sapi yang belum disapih untuk memproduksi keju.

Protease dimanfaatkan untuk pengolahan seperti dalam industri susu, pembuatan roti, industri pengolahan kedelai, penghilangan rasa pahit dari hasil hidrolisa protein dan untuk pembuatan pemanis buatan rendah kalori. Selain itu, protease juga digunakan pada industri deterjen dan pada bidang kesehatan serta industri kulit, sebagai agensia untuk melepaskan rambut (Rao *et al.*, 1998).

Protease tumbuhan, yang berasal dari buah pepaya (*Carica papaya*) dikenal sebagai papain, bromelin berasal dari buah nenas dan fisin berasal dari tumbuhan spesies *Ficus sp.* (Suhartono, 1992). Protease yang berasal dari hewan adalah tripsin, kimotripsin, pepsin dan renin. Mikroorganisme dapat pula menghasilkan protease, yang umumnya berasal dari bakteri, umumnya, berupa protease netral dan alkali yang dihasilkan dari genus *Bacillus sp.*, serta dari kapang seperti *Aspergillus oryzae* (Rao *et al.*, 1998).

### Klasifikasi Protease

Secara umum, protease diklasifikasikan atas proteinase dan peptidase. Proteinase mengkatalisis hidrolisis molekul protein menjadi fragmen-fragmen besar, sedangkan peptidase mengkatalisis hidrolisis fragmen polipeptida menjadi asam amino (Muchtadi *et al.*, 1992 dan Suhartono, 1992).

Klasifikasi protease menurut *Nomenclature Committee of The International Union of Biochemistry and Molecular Biology* dimasukkan ke dalam kelompok 3 (hidrolase) dengan subkelompok 4 (khusus enzim yang bekerja pada ikatan peptida). (Suhartono, 1992). Walau demikian, protease tidak dengan mudah dikelompokkan kedalam sistem tata nama enzim karena cara kerja dan strukturnya yang beragam. Protease, berdasarkan letak pemecahan ikatan peptida, dibagi menjadi eksopeptidase dan endopeptidase (Tabel 1). Eksopeptidase memutuskan ikatan peptida dari ujung luar pada gugus amino terminal dan gugus karboksil terminal. Endopeptidase memotong peptida pada gugus dalam. Berdasarkan kelompok fungsional pada sisi aktifnya protease terbagi menjadi protease serina, aspartat, sistein dan logam. Protease serina adalah enzim yang mempunyai residu serina pada sisi aktifnya, sedangkan protease aspartat atau protease asam memiliki residu asam aspartat pada sisi katalitiknya. Protease thiol atau protease sistein pada sisi aktifnya mengandung sistein dan histidin. Protease logam adalah enzim yang memerlukan ion logam divalen untuk reaksi katalisnya (Rao *et al.*, 1998).

Awalnya, protease dibuat dengan mengekstrak pankreas atau lambung ketiga dari anak sapi yang masih menyusui atau dari tumbuhan, tetapi mengingat kebutuhan enzim dunia semakin meningkat saat ini, jadi kemungkinan pemenuhan enzim dari pankreas sangat tidak mungkin karena keterbatasan dari sumbernya yaitu

sapi. Salah satu solusi yang diajukan untuk memenuhi kebutuhan atau permintaan enzim dunia adalah dengan mencari sumber lain, diantaranya berasal dari mikroba.

Tabel 1. Klasifikasi Protease

Protease	Jenis reaksi	No. EC
<b>Eksopeptidase</b>		
Aminopeptidase	● ↑ ○ ○ ○ ○	3.4.11
Dipeptidil peptidase	● ● ↑ ○ ○ ○ ○	3.4.14
Tripeptidil peptidase	● ● ● ↑ ○ ○ ○	3.4.14
Karboksipeptidase	○ ○ ○ ○ ○ ○ ↓ ●	3.4.16-3.4.18
Protease tipe serina		3.4.16
Protease metal		3.4.17
Protease tipe sistein		3.4.18
Peptidil dipeptidase	○ ○ ○ ○ ○ ○ ↓ ● ●	3.4.15
Dipeptidase	● ●	3.4.13
Omega peptidase	○ ○ ○ ○ ○ ○ ↓ ○	3.4.19
	○ ○ ○ ○ ○ ○ ↓ ● ○	3.4.19
<b>Endopeptidase</b>		
Protease serina	○ ○ ○ ○ ○ ○	3.4.21
Protease sistein		3.4.22
Protease aspartat		3.4.23
Protease metal		3.4.24
Endopeptidase dari enzim yang belum diketahui mekanisme katalitiknya		3.4.99

Keterangan : Lingkaran terbuka (○) menunjukkan residu asam amino pada rantai polipeptida. Lingkaran tertutup (●) menunjukkan terminal asam amino, tanda panah (↓) menunjukkan tempat aksi dari enzim dan bintang (\*) menunjukkan gugus amino atau karboksil terlindung (protected).

Sumber: Rao *et al.* (1998)

Puvanakrishnan dan Dhar (1988) menyatakan, bahwa penggunaan mikroba sebagai sumber enzim harus memenuhi pertimbangan-pertimbangan sebagai berikut:



- @Hak cipta milik IPB University**
- a) untuk produksi tidak memerlukan tempat yang luas
  - b) tidak ada batasan dalam produksi dan persediaan
  - c) dalam produksinya tidak menghasilkan ikutan (by-product)
  - d) biaya produksi rendah
  - e) pertumbuhan mikroorganisme dapat dimodifikasi untuk mendapatkan produksi enzim yang diinginkan
  - f) dari satu strain dapat dihasilkan banyak enzim, dan
  - g) ada kemungkinan untuk pengembangan sistem enzim baru

Selain hal-hal di atas, enzim dari mikroba ini mempunyai nilai pH yang lebih luas dan bentuk substrat yang lebih banyak (Stanley, 1994).

### Penyamakan Kulit

Proses penyamakan kulit adalah suatu cara mengubah kulit mentah menjadi kulit jadi (finished leather). Menurut Judoamidjojo (1974), serta Sulistyah dan Sunaryo (1997), proses penyamakan terdiri atas :

- a) proses siap samak atau proses pra penyamakan (beam house)
- b) proses penyamakan (tanning)
- c) proses penyelesaian (finishing)

Proses pra penyamakan terdiri atas proses perendaman, pengapur, pembuangan kapur dan pengasaman, kemudian pada proses penyamakan hanya terdiri atas proses penyamakan itu sendiri. Proses terakhir dari keseluruhan proses penyamakan kulit adalah proses penyelesaian (finishing) meliputi penetralan, pewarnaan, pelemakan, pengeringan dan terakhir pengecatan untuk mendapatkan hasil warna luar yang lebih baik.

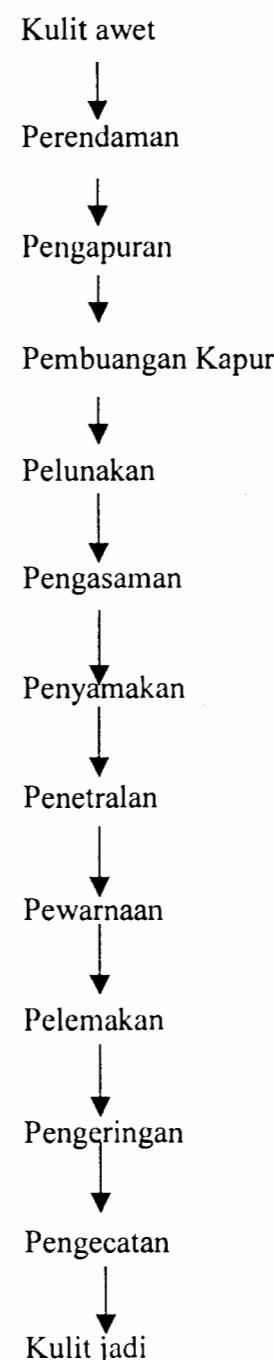
Proses rumah basah (beam house process) pada industri penyamakan kulit merupakan proses yang sangat penting, sehingga ada pepatah “Kulit dibuat di rumah basah” (Puvanakrishnan dan Dhar, 1988). Proses rumah basah merupakan dasar untuk menjadikan kulit menjadi siap untuk disamak.

Bahan-bahan yang digunakan pada proses untuk melepaskan rambut adalah natrium disulfida ( $\text{Na}_2\text{S}$ ) dan  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ . Tahap ini juga merupakan tahap yang menghasilkan polusi tertinggi (Cromogenia Units, 1995), sehingga menyebabkan industri-industri penyamakan kulit di beberapa negara hampir ditutup. Agensi ini

berdampak buruk pada lingkungan berupa air buangannya dan kepada para pekerja (Brady *et al.*, 1990). Salah satu cara yang disarankan untuk mengurangi produksi limbah pada tahap ini adalah melalui substitusi Na<sub>2</sub>S dengan protease (Puvanakrishnan dan Dhar, 1988).

Proses penyamakan kulit secara umum, mengikuti tahapan seperti pada

Gambar 1.



Gambar 1. Proses Penyamakan Kulit (Judoamidjoyo, 1974)

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah  
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



## Penggunaan Enzim dalam Proses Pelepasan Rambut

Proses pelepasan rambut ini, baik secara umum maupun konvensional, dilakukan pada proses pengapuran, melalui perusakan membran basalis pada epidermis sehingga rambut dapat terlepas (Judoamidjojo, 1974). Secara umum, pelepasan rambut dicapai melalui salah satu dari dua metode berikut, yaitu melalui (i) penyerangan terhadap rambut dan mereduksinya hingga menjadi bubur, atau (ii) melalui penghancuran atau memodifikasi jaringan epidermis di sekitar bulatan akar rambut, sehingga rambut terlepas dan dapat dibuang secara mekanis (Puvanakrishnan dan Dhar, 1988). Bahan yang umum digunakan pada proses pengapuran adalah Na<sub>2</sub>S karena paling murah. Prinsip pelepasan rambut adalah pemutusan jembatan S-S dari sistein.

Penggunaan protease pada industri kulit, semula hanya diterapkan pada proses pelumatan atau pelunakan. Protease juga melemaskan jaringan serat-serat kolagen dan protein elastin, sehingga kulit dapat disamak dan dilembabkan untuk menghasilkan kulit jadi (finished leather). Saat ini, pemanfaatan enzim pada industri penyamakan kulit tidak hanya pada pelunakan, tetapi juga proses-proses lain seperti perendaman, pelepasan rambut dan pembuangan lemak (Feigel, 1995; Puvanakrishnan dan Dhar, 1988). Salah satu keuntungan dari penggunaan enzim pada proses pelepasan rambut adalah kondisi rambut atau wol yang dilepas masih dalam keadaan baik. Penggunaan enzim pada proses pengapuran menghilangkan tahap proses penghilangan kapur serta pelumatan (Heryemen dan Vlimerer, 1989).

Keuntungan utama dari pelepasan rambut secara enzimatik adalah lingkungan tidak terganggu oleh limbah yang berasal dari kulit mentah (Brady *et al.*, 1990). Puvanakrishnan dan Dhar (1988) melaporkan, bahwa penggunaan enzim dalam pelepasan rambut dapat mengurangi nilai Biochemical Oxygen Demand (BOD) dan rambut tetap utuh. Enzim sebagai pengganti agensi pelepas rambut inorganik menurunkan nilai BOD dan Chemical Oxygen Demand (COD) yang berasal dari rumah basah (Sulistyah dan Sunaryo, 1997) dengan perbandingan antara metode pelepasan rambut umumnya dan enzimatik diperoleh penurunan nilai BOD sebesar 79-82%, COD 68-70%, N-NH<sub>3</sub> 93-96%, minyak/lemak 31-41%, S 71-76%, TSS (Total Solid Suspended) 88-90%. Cromogenia Units (1995) menyatakan, bahwa penggunaan enzim dengan tetap menggunakan 1% sulfida, diperoleh reduksi COD

sebesar 30-40%, BOD 30-40%, S (sulfida anion) 50-65%, dan total padatan 65-80%, dengan peningkatan daya kembali kulit sekitar 2%.

### Mekanisme Pelepasan Rambut

@Hakipuniversitasity  
Puvanakrishnan dan Dhar (1988) dalam *Enzyme Technology In Beamhouse Practice*, memaparkan penelitian yang telah dilakukan mengenai mekanisme pelepasan rambut. Eilis (1945) menyatakan, bahwa enzim mencerna sel basal dari akar rambut secara histologis. Urutan pelepasan rambut dinyatakan oleh Puvanakrishnan dan Dhar (1988) dimulai dari lapisan terluar lalu dilanjutkan dengan pembengkakan dan pemecahan lapisan dalam akar dan bagian dari rambut yang terkeratinase.

Menurut Chu (1981) seperti dikutip oleh Puvanakrishnan dan Dhar (1988), enzim masuk ke dalam kulit hanya melalui sisi daging ketika proses pelepasan rambut dilakukan pada suhu ruang. Yates (1968) seperti dikutip oleh Puvanakrishnan dan Dhar (1988) telah meneliti kemungkinan penggunaan tripsin kristal dan  $\alpha$ -amilase sebagai agensia pelepas rambut. Penulis yang sama menyatakan bahwa aktivitas kedua enzim tersebut sebagai perontok rambut berkorelasi erat dengan penyerangan terhadap plasma darah, kasein dan beberapa substrat protein. Pelepasan dari heksosa selama tingkat awal pelepasan rambut berhubungan dengan hilangnya kolagen yang disimpan sel dalam lapisan luar akar, sebelum ada perubahan dalam struktur folikel.

Perontokan rambut oleh enzim proteolitik disebabkan adanya peluruhan komponen globular dan protein, bukan serat dari membran dasar pada lapisan jembatan antara dermis dan epidermis. Setelah itu, proses dilanjutkan dengan epidermis dan menyalut akar rambut. Membran dasar ini mengikat epidermis dengan dermis, sehingga menyebabkan pembuangan secara berkesinambungan dari epidermis dan rambut-rambut di sekitarnya.



## Bahan

Enzim yang digunakan berupa enzim kasar yang dihasilkan dari *Bacillus megaterium* DSM 319 (koleksi Pusat Pengkajian dan Penerapan Teknologi Bioindustri, BPP Teknologi, Serpong) dengan menggunakan media lokal molases (terdiri dari molases 2% dan urea 1%).

Bahan kimia untuk mengukur kadar protein, aktivitas protease dan uji sifat-sifat enzim adalah *bovine serum albumin* (BSA), tirosin, Tri Chloroacetate Acid (TCA) CaCl<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaOH, *Commassie Brilliant Blue G-250*, Folin-Ciocalteu's phenol reagent, kasein "Hammerstein", asam fosfat 15%, aquades dan HCl.

Bahan kimia untuk (Sodium Diodecyl Sulphate- Poly Acrilamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) adalah Triton X-100, ammonium persulfat, N, N, N', N' -tetramethylene-ethylenediamine (TEMED), akrilamid, Bis-akrilamid, gliserol, HCl, *bromophenol blue*, Tris dan Coomasie Brilliant Blue R-250. Bahan substrat yang digunakan adalah kasein "Hammerstein". Semua bahan baik untuk PAGE dan substrat berasal dari Sigma (Saint Louis, Mo., USA). Penanda protein dari Ammersham Pharmacia yang terdiri dari Fosforilase b otot kelinci (94 kD), Bovine Serum Albumine (BSA) (66,5 kD), ovalbumin putih telur ayam (43 kD), karbonik anhidrase eritrosit bovin (30 kD), inhibitor tripsin kedelai (20,1 kD) dan  $\alpha$ -laktalbumin susu sapi (14,2 kD). Kulit yang digunakan untuk pengujian enzim adalah kulit sapi bagian paha yang diperoleh dari Rumah Potong Hewan Bogor, dengan kisaran luas  $\pm 450 \text{ cm}^2$ .

## MATERI DAN METODE PENELITIAN

### Waktu dan Tempat

Penelitian dilakukan dari bulan September 2001 sampai bulan Agustus 2002. Penelitian bertempat di laboratorium Bioindustri Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT), Kompleks Pusat Pengembangan Ilmu Pengetahuan dan Teknologi (Puspiptek), Serpong.

### Bahan dan Alat

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang  
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

- Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
- Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Peralatan yang digunakan dalam percobaan yaitu penangas air, spektrofotometer "U-2001 Hitachi", piranti elektroforesis gel vertical "Biorad" (Germany), pemusing mikro "201 M Sigma" dan pemusing berpendingin "ALC", pengaduk magnetik, lemari es, timbangan analitik, alat-alat gelas, tabung mikro, *freezer*, mikro pipet, vorteks, rak tabung reaksi, tabung reaksi.

### Metode

Produksi protease menggunakan media lokal yaitu molases. Fermentasi dilakukan pada Biostat fermentor yang diagitasi pada kecepatan 250 rpm, aerasi 1 vvm, suhu 37 °C dan pH 7,5 selama 24 jam. Enzim yang dihasilkan merupakan hasil sekresi dari mikroba ke dalam media fermentasi, atau enzim ekstrakseluler. Enzim dipekatkan dengan mikrofiltrasi, selanjutnya dipekatkan lagi dengan ultrafiltrasi.

Penelitian diawali dengan penghitungan aktivitas enzim dan penentuan kadar protein dari enzim setelah pemekatan dengan mikrofiltrasi dan setelah pemekatan dengan ultrafiltrasi. Enzim yang tidak secara langsung dihitung aktivitasnya disimpan dalam refrigerator atau lemari es ( $\pm 4$  °C). Penelitian dilanjutkan dengan mencari pH dan suhu optimum dari aktivitas protease. Penggolongan protease diidentifikasi dengan mereaksikan enzim dengan senyawa penghambat protease logam EDTA (Ethylene Diamine Tetra Acetate) dan senyawa penghambat protease serina PMSF (Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride). Jika protease dihambat dengan EDTA maka langkah selanjutnya adalah mencari ion divalen yang membantu mengikat substrat dan mempertahankan aktivitas. Pengujian juga dilakukan pada bahan-bahan penyusun zimogram dan SDS-PAGE, yaitu SDS dan Triton X-100. Bahan-bahan ini biasa disebut dengan deterjen. Deterjen SDS digunakan baik pada zimogram dan SDS-PAGE, sedangkan Triton X-100 hanya digunakan dalam zimogram. Pengujian ini dilakukan untuk melihat aktivitas dari protease terhadap bahan-bahan ini, untuk mencegah penurunan aktivitas enzim. Zimogram digunakan untuk memperkirakan berat molekul protease dengan substrat yang digunakan adalah kasein. Aktivitas proteolitik enzim diuji terhadap berbagai jenis protein yaitu BSA,

gelatin, kolagen, elastin, hemoglobin dan keratin, yaitu jenis-jenis protein yang erat hubungannya dengan komponen pada kulit.

## Produksi dan Pemekatan Enzim

Enzim yang akan digunakan diproduksi dengan menggunakan media lokal molases. Protease yang akan dikarakterisasi merupakan hasil pemekatan dengan mikrofiltrasi Milipore” dengan pori-pori 10  $\mu\text{l}$ . Pemekatan lanjutan dilakukan dengan ultrafiltrasi “Milipore”. Membran yang digunakan dalam ultrafiltrasi adalah 30kD (kilodalton).

## Penentuan Kadar Protein (Bradford, 1984)

Pengukuran kadar protein larutan enzim ekstraseluler dari *Bacillus megaterium* DSM 319 yang berupa enzim kasar dilakukan dengan metode Bradford (1976). Larutan Bradford dibuat dengan melarutkan dalam 100 mg *Coomasie blue G-250* dalam 50 ml etanol 95%, selanjutnya dilarutkan kembali 100 ml asam fosfat 85% dan ditambahkan aquades sampai 1 liter. Larutan Bradford yang terbentuk diencerkan lima kali (1 bagian larutan Bradford diencerkan dengan 4 bagian aquades). Kurva standar ditentukan dengan BSA pada konsentrasi beragam dari 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; dan 0,6 (mg/ml). Masing-masing konsentrasi diambil 40 $\mu\text{l}$  dan dilarutkan dalam 2000 $\mu\text{l}$  larutan Bradford yang sudah diencerkan lima kali. Setelah diinkubasi pada suhu ruang ( $\pm 28^\circ\text{C}$ ) selama 15 menit pengukuran dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm.

## Pengukuran Aktivitas Protease menurut Metode Walter (1984) yang Dimodifikasi (Wahyuntari, 2001)

Prosedur pengukuran aktivitas enzim berdasarkan metode Walter (1984) menggunakan substrat kasein atau hemoglobin (Tabel 2). Metode ini dilakukan dengan membandingkan nilai absorbansi (A) antara sampel dengan standar dan blanko. Nilai-nilai absorbansi tersebut dihitung dengan persamaan:

$$\text{Aktivitas Enzim} = \frac{(A_{\text{contoh}} - A_{\text{blanko}})}{(A_{\text{standar}} - A_{\text{blanko}})} \times \frac{\text{faktor pengenceran enzim}}{\text{waktu reaksi}} (\text{U/ml.})$$

Faktor pengenceran enzim dituliskan satu karena enzim tidak diencerkan, tetapi jika enzim diencerkan maka nilai pengenceran dimasukkan ke dalam perhitungan

sesuai dengan pengenceran yang dilakukan. Waktu reaksi adalah waktu yang diperlukan untuk menginkubasi substrat, dalam hal ini 10 menit.

Aktivitas protease pada penelitian ini diukur berdasarkan metode Walter (1984) dalam Wahyuntari (2001) melalui modifikasi jumlah dan perekasi untuk pewarnaan. Penghitungan nilai aktivitas enzim serupa dengan metode Walter (1984), yaitu dengan melihat nilai absorbansi dari blanko, standar dan sampel. Nilai absorbansi tersebut dikonverikan ke dalam persamaan aktivitas enzim pada metode Walter (1984).

Tabel 2. Tahapan Pengujian Aktivitas Protease dengan Metode Walter (1984)

Pereaksi	Blanko ( $\mu\text{l}$ )	Standar ( $\mu\text{l}$ )	Sampel ( $\mu\text{l}$ )
Kasein (1%) dalam buffer Universal *	2500	2500	2500
Tirosin Standar (5mM)	-	200	-
Enzim dalam $\text{CaCl}_2$ (2mM)	-	-	200
Aquades	200	-	-
Diinkubasi selama 10 menit pada suhu yang uji**			
TCA (0,1 M)	5000	5000	5000
Enzim dalam $\text{CaCl}_2$	200	200	-
Aquades	-	-	200
Diinkubasi selama 10 menit pada suhu ruang, sentrifus 20 menit ( 4000 rpm)			
Filtrat	2500	2500	2500
NaOH (0,5M)	5000	5000	5000
Pereaksi Folin-Ciocalteau	1500	1500	1500
Divortex, diinkubasi pada suhu ruang selama 20 menit, lalu diukur absorbansinya pada $\lambda=578 \text{ nm}$			

Ket : \* pH digunakan untuk buffer adalah pH 7,5, tetapi untuk mengetahui pengaruh pH maka dilakukan perubahan pH dari buffer.  
 \*\* Suhu yang digunakan adalah 37 °C. Suhu ini yang digunakan oleh Walter pada saat menginkubasi substrat. Pengaruh dari suhu dilakukan dengan mengubah suhu pada tahap ini sesuai dengan rentang suhu yang dikehendaki.

Sumber : Bergmeyer *et al.* (1988).

Tabel 3. Metode Walter yang Dimodifikasi (Wahyuntari, 2001)

Pereaksi	Blanko ( $\mu\text{l}$ )	Standar ( $\mu\text{l}$ )	Sampel ( $\mu\text{l}$ )
Kasein (1%) dalam buffer Universal (pH 7)*	400	400	400
Tirosin Standar (5mM)	-	50	-
Enzim dalam $\text{CaCl}_2$ (2mM)	-	-	50
<b>Aquades</b>			
Diinkubasi selama 10 menit pada suhu tertentu **			
TCA (0.1 M)	500	500	500
Enzim dalam $\text{CaCl}_2$	50	50	-
Aquades	-	-	50
Diinkubasi selama 10 menit pada suhu ruang, sentrifus 2 menit ( 10.000 rpm)			
Filtrat	600	600	600
$\text{Na}_2\text{CO}_3$ (0.4M)	2000	2000	2000
Pereaksi Folin-Ciocalteau	400	400	400
Divortex, diinkubasi pada suhu ruang selama 20 menit, lalu diukur absorbansinya pada $\lambda=578 \text{ nm}$			

- Ket : \* Buffer Universal diubah-ubah dari pH 6-11 untuk mengetahui pengaruh pH terhadap aktivitas protease (Analisis pengaruh ph terhadap aktivitas protease dilakukan pada suhu fermentasi )  
 \*\* Suhu inkubasi diubah-ubah (20-60°C) untuk mengetahui pengaruh suhu terhadap aktivitas protease (analisis pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim dilakukan pada pH optimum aktivitas enzim).

### Penentuan pH dan Suhu Optimum Aktivitas Protease

Pengamatan pengaruh pH terhadap aktivitas proteolitik protease dilakukan dengan cara mengubah pH dari larutan kasein 1% (b/v) pada variasi pH dari 6, 7, 8, 9, 10 dan 11. Penentuan pH larutan kasein dilakukan dengan melarutkan 0,1 g kasein dalam 5 ml aquades yang sudah ditambah satu tetes larutan B, kemudian ke dalamnya ditambahkan larutan A dari buffer universal hingga dihasilkan pH yang diinginkan (cara pembuatan larutan A dan B dari buffer universal dapat dilihat pada Lampiran 1). Volume larutan kasein yang digunakan sebanyak 10 ml, jumlah ini diperoleh dengan menambahkan aquades pada pH yang sama dengan larutan kasein hingga mencapai 10 ml. Analisis pengaruh pH dilakukan pada suhu fermentasi yaitu

37 oC. Pengamatan pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim dilakukan dengan mengubah suhu inkubasi dari 20-60 °C dengan selang 5 °C, kecuali pada suhu 35 °C dilakukan pada suhu fermentasi (37 °C). Analisis pengaruh suhu dilakukan pada pH optimum (8,0) yang telah diperoleh pada tahap sebelumnya.

### Pengaruh Penghambat EDTA dan PMSF

Senyawa penghambat protein spesifik untuk protease logam EDTA (Ethylene Diamine Tetra Acetate) dan protease serina PMSF (Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride) diuji pada enzim dengan konsentrasi 2 mM dan 5 mM. Enzim diinkubasi pada senyawa-senyawa tersebut dengan konsentrasi akhir 2 mM dan 5 mM selama 1 jam pada suhu ruang ( $\pm$  28 °C), kemudian aktivitas enzim diuji dengan metode Walter (1984) yang dimodifikasi (Wahyuntari, 2001). Pembandingan dilakukan antara nilai aktivitas enzim yang diperlakukan dengan senyawa penghambat dan enzim yang tanpa perlakuan. Uji aktivitas ini dilakukan pada suhu dan pH optimum.

EDTA adalah senyawa penghambat bagi protease logam. Senyawa ini mengelat logam sehingga logam tidak dapat lagi berikatan dengan enzim, sehingga enzim menjadi tidak aktif (Beynon 1989 dalam Harris dan Angals, 1989). Metaloprotease atau protease logam adalah protease yang aktivitasnya tergantung pada ion dan dihambat oleh senyawa pengkelat logam. Senyawa-senyawa pengkelat logam ini mengikat logam-logam yang seharusnya mengaktifkan enzim. Senyawa PMSF adalah senyawa yang menghambat protease serina dan menghambat semua protease serina (Beynon 1989 dalam Harris dan Angals ,1989). Pengujian ini bertujuan untuk menentukan jenis protease yang terkandung dalam larutan enzim ekstrasel *Bacillus megaterium* DSM 319.

Apabila protease *Bacillus megaterium* DSM 319 termasuk protease logam, maka beberapa ion logam (CaCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> dan FeCl<sub>2</sub>) diuji pengaruhnya terhadap aktivitas enzim. Enzim beserta logam masing-masing pada konsentrasi akhir 0,5 mM, 2 mM, 3,5 mM dan 5 mM, diinkubasi pada suhu ruang selama 1 jam, lalu diukur aktivitasnya. Pengaruh dari logam, ditentukan dengan membandingkan antara aktivitas enzim yang diinkubasi dengan logam dan enzim yang tidak diinkubasi dengan logam.

## Pengujian Protease *Bacillus megaterium* DSM 319 terhadap Berbagai Substrat dengan Metode Elektroforesis

Analisis gel elektroforesis dilakukan dengan menggunakan piranti elektroforesis gel poliakrilamida atau lebih dikenal dengan PAGE (Poly Acrylamide Gel Electrophoresis) "Biorad" dengan plat vertikal (ukuran 99 mm x 110 mm x 7 mm). Voltase yang digunakan untuk proses elektroforesis adalah 150 V dengan 100 mA sampai warna biru dari sampel buffer yang berisi *bromophenol blue* mencapai sekitar 1 cm dari bagian bawah gel dan waktu tempuh diperkirakan selama 2,5 jam.

SDS-PAGE (Tabel 4) digunakan untuk melihat aktivitas enzim terhadap beberapa jenis substrat protein. Substrat-substrat yang diujikan dengan enzim adalah kasein, BSA, hemoglobin, kolagen, gelatin, elastin dan keratin. Protein seperti kasein, hemoglobin dan gelatin dilarutkan dengan air sedangkan kolagen, elastin dan keratin dilarutkan dalam urea 2%. Hasil elektrofosis terhadap berbagai substrat yang direaksikan dengan enzim dan tanpa enzim (kontrol) dibandingkan untuk menentukan kemampuan hidrolisis enzim terhadap substrat. Pada substrat yang direaksikan dengan enzim, substrat direaksikan dalam pereaksi sesuai dengan metode Walter (1988) yang dimodifikasi, sedangkan untuk substrat yang tidak direaksikan substrat dilarutkan pada larutan penyanga Tris-HCl pada pH 8. Hidrolisa enzim terhadap substrat ditunjukkan oleh tidak dijumpainya kembali atau berkurangnya pita-pita protein yang terbentuk terhadap kontrol.

Tabel 4. Komposisi Bahan-bahan untuk SDS-PAGE

Bahan	<i>Separating Gel 8%</i>	<i>Stacking Gel 5%</i>
Pelarut A (μl)	1600	334
Pelarut B (μl)	1500	-
Pelarut C (μl)	-	500
dH <sub>2</sub> O steril (μl)	2845	1131
Ammonium persulfat (μl)	50	25
TEMED (μl)	5	5
Total (μl)	6000	2000

Sumber : Bollag dan Edelstein (1991)

## Pengaruh Deterjen terhadap Aktivitas Enzim

Sebelum dilakukan zimogram untuk memperkirakan berat molekul (BM) enzim, terlebih dahulu harus dipelajari pengaruh bahan-bahan yang digunakan pada zimogram terhadap aktivitasnya seperti SDS dan Triton X-100.. Dua konsentrasi SDS yang digunakan yaitu 0,1% dan 0,4%. Pengujian dilakukan dengan cara menambahkan SDS 0,1% ke dalam enzim, lalu diinkubasi pada suhu kamar ( $\pm 28^{\circ}\text{C}$ ) selama 30 menit, dan ke dalam campuran ditambah Triton X-100 pada konsentrasi 0,5%, 2%, 3,5% dan 5%. Campuran ini diinkubasi pada suhu ruang ( $\pm 28^{\circ}\text{C}$ ) selama 1 jam, setelah itu campuran diuji aktivitasnya dan sebagai kontrol adalah enzim tanpa perlakuan. Pengujian yang sama dilakukan dengan penambahan SDS 0,4%. Jika hasil pengujian menunjukkan bahwa aktivitas enzim tidak mengalami perubahan yang nyata, maka bahan-bahan tersebut dapat digunakan, sebaliknya jika enzim mengalami penurunan yang besar (aktivitas akhir kurang dari 60%) maka bahan tersebut tidak digunakan sebagai perekusi pada proses elektroforesis.

Tabel 5. Komposisi Bahan-bahan untuk Zimogram

Bahan	Separating Gel 8%	Stacking Gel 5%
Pelarut A ( $\mu\text{l}$ )	1600	334
Pelarut B ( $\mu\text{l}$ )	1500	-
Pelarut C ( $\mu\text{l}$ )	-	500
dH <sub>2</sub> O steril ( $\mu\text{l}$ )	2839	1131
0,1% kasein ( $\mu\text{l}$ )	6	-
Ammonium persulfat ( $\mu\text{l}$ )	50	25
TEMED ( $\mu\text{l}$ )	5	5
Total ( $\mu\text{l}$ )	6000	2000

Sumber: Freidrich dan Antranikian (1996)

## Penentuan Berat Molekul Protease dengan Zimogram

Zimogram (Tabel 5) digunakan untuk mengamati pita protein dalam larutan enzim ekstraseluler kasar yang memiliki aktivitas proteolitik. Metode zimografik yang digunakan merupakan modifikasi dari metode Freidrich dan Antranilian (1996). Matrix gel untuk analisis zimogram adalah kasein 0,1% (b/v) yang dikopolimerisasi oleh akrilamida dengan konsentrasi 8%. Pengujian dilakukan melalui pencampuran



enzim pada larutan penyangga contoh yang berisi 5x sample buffer dengan perbandingan 1:4, lalu di-*running* dalam 10% SDS-PAGE dengan 0,1% kasein. Setelah elektroforesis, gel direndam dalam larutan penyangga Triton X-100 2,5% mM selama 20 menit. Larutan Triton X-100 dibuang lalu diganti dengan larutan penyangga Tris-HCl (pH 8) pada suhu 30 °C dalam *shaking waterbath* selama 20 menit. Reaksi dihentikan dengan membuang larutan penyangga dan menggantinya dengan larutan TCA 10%, selanjutnya diinkubasi sejama 15 menit. Pewarnaan dilakukan dengan Commassie Brilliant Blue R-250. Gel tersebut direndam selama 30-60 menit dan pada akhir tahap gel direndam dalam larutan peluntur warna berlapis-lapis sehingga pita-pita proteolitik dapat terlihat.

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
  - b. Pengutipan titik merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

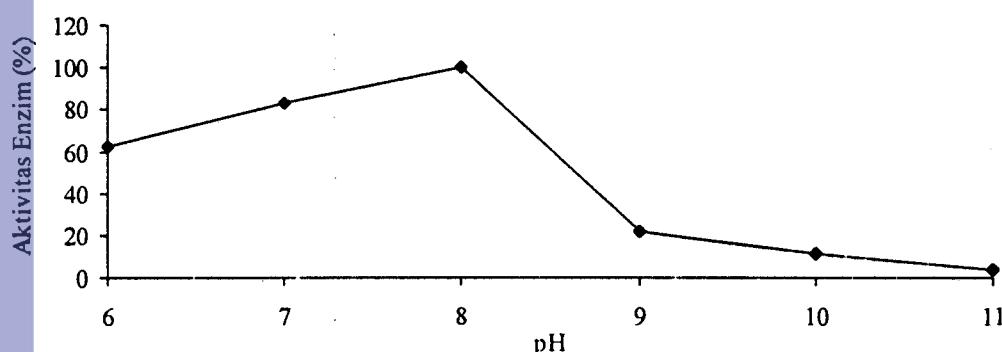
## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Produksi dan Pemekatan Protease *Bacillus megaterium* DSM 319

Enzim kasar yang digunakan merupakan hasil mikrofiltrasi, selanjutnya enzim ini dipekatkan lagi dengan ultrafiltrasi. Hasil yang diperoleh dari proses ultrafiltrasi, enzim mengalami peningkatan aktivitas sebesar 235% (0,9453 U/mg) jika dibandingkan dengan enzim hasil mikrofiltrasi (0,4022 U/mg). Peningkatan dari aktivitas ini disebabkan oleh karena kotoran-kotoran yang terdapat dalam larutan enzim telah terbuang melalui proses pemurnian mikrofiltrasi dan ultrafiltrasi.

### Penentuan pH Optimum dari Aktivitas Protease *Bacillus megaterium* DSM 319

Protease mempunyai pH optimum yang spesifik yaitu berbeda antar protease dari sumber yang berbeda. Pada pH optimum ini, aktivitas enzim menjadi maksimal, sehingga hidrolisis substrat menjadi maksimum. Profil aktivitas pH enzim menggambarkan pH pada saat gugus pemberi atau penerima proton yang penting pada sisi katalitik enzim berada dalam tingkat ionisasi yang diinginkan. Profil pH optimum ini tidak harus sama dengan pH fermentasi ( $37^{\circ}\text{C}$ ) atau pH yang digunakan untuk memproduksi enzim, pH aktivitas optimum ini dapat berada lebih tinggi atau lebih rendah darinya. Aktivitas protease *Bacillus megaterium* DSM 319 pada berbagai pH dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Kurva pH Optimum Protease *Bacillus megaterium* DSM 319

Aktivitas protease *Bacillus megaterium* DSM 319 berbeda pada pH yang berbeda dan optimum pada pH 8 dengan aktivitas maksimum sebesar 100% (Gambar 2). Penurunan nilai aktivitas diperoleh ketika pH lingkungan protease berada dibawah dan diatas pH optimum. Aktivitas protease *Bacillus megaterium*



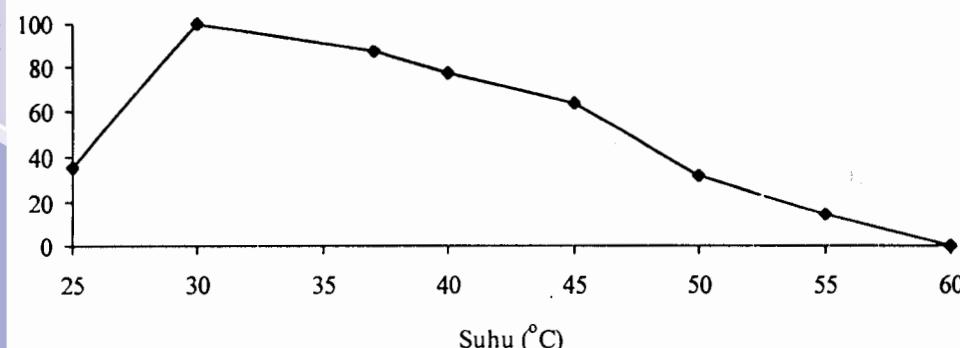
DSM 319 masih dapat dipertahankan dengan sisa aktivitas lebih dari 60%, antara pH 6-8, dan turun secara drastis bila pH ditingkatkan dari 8 hingga 11.

Enzim pada umumnya bersifat amfolytik, berarti enzim mempunyai konstanta disosiasi baik pada gugus asam maupun pada gugus basa, terutama pada gugus residu terminal karboksil dan gugus terminal aminonya (Winarno, 1995). Gugus ionik dari enzim berperan menjaga konformasi dari sisi aktif dalam mengikat substrat dan alam mengubah substrat menjadi produk (Muchtadi *et al.*, 1992). Aktivitas enzim dapat bervariasi tergantung pada pH yang mempengaruhi daya ionisasi pada rantai samping asam amino penyusunannya, baik pada sisi aktif maupun pada sisi lain. Hal ini secara tidak langsung mempengaruhi konformasi sisi aktif enzim, yang tergantung pada kondisi sekitarnya (Webb dan Dixon, 1979).

### **Penentuan Suhu Optimum Aktivitas Protease *Bacillus megaterium* DSM 319**

Secara umum, peningkatan suhu akan menyebabkan peningkatan aktivitas protease. Protease sebagai enzim mempunyai sifat-sifat protein, peningkatan suhu dapat meningkatkan aktivitas protease, tetapi setelah diperoleh suhu optimum, aktivitas protease akan mengalami penurunan karena protein cenderung untuk mengalami denaturasi. Kondisi optimum membuat enzim berada dalam keadaan stabil sehingga enzim dapat bekerja secara maksimal (Lehninger, 1982).

Suhu optimum protease dari *Bacillus megaterium* DSM 319 adalah 30°C dengan aktivitas 100% (Gambar 3). Aktivitas protease pada suhu fermentasi (37 °C), yaitu suhu yang digunakan untuk memproduksi enzim, bersisa sebesar 99,42%, nilai ini tidak terlalu jauh dari nilai aktivitas optimum, penurunan yang terjadi hanya sebesar 0,48%, sehingga pada suhu ini masih dapat digunakan sebagai suhu inkubasi. Inkubasi enzim pada kisaran suhu antara 37 °C sampai 45 °C mampu mempertahankan aktivitasnya lebih dari 60%, sedangkan pada suhu kurang dari 26 °C dan lebih dari 46 °C akan menghasilkan aktivitas yang semakin rendah. Protease *Bacillus megaterium* DSM 319 diketahui tidak aktif pada suhu 60 °C, yang berarti enzim bersifat termo labil.

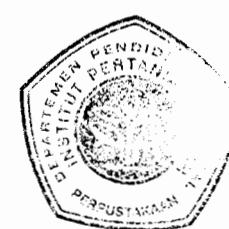


Gambar 3. Kurva Suhu Optimum dari Aktivitas Enzim Protease

Suhu optimum diperoleh dengan menguji enzim pada pH optimum (pH 8).

Pengamatan aktivitas protease pada suhu berbeda dan pH berbeda mendapatkan aktivitas sebesar 100% (0,9453 U/mg). Protease pada suhu rendah (4 °C) memiliki kestabilan yang tinggi tetapi aktivitasnya rendah, sedangkan pada kisaran suhu optimum 30-37 °C, aktivitasnya tinggi tetapi stabilitasnya rendah (Mucthadi *et al.*, 1992).

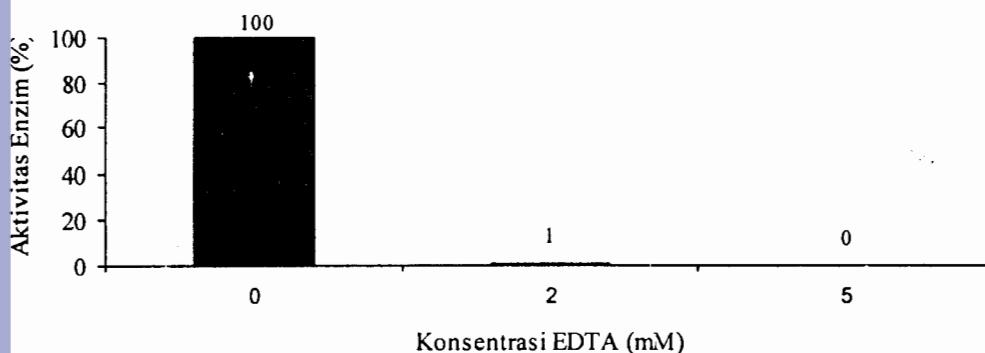
Kondisi pH dan suhu optimal ini membuat enzim berada dalam keadaan stabil, sehingga enzim dapat mengkonversi substrat secara optimal. Enzim ini akan digunakan untuk proses pelepasan rambut pada industri penyamakan kulit. Enzim yang digunakan pada industri kulit mula-mula berasal dari ekstrak pankreas. Protease dari pankreas, yaitu tripsin, digunakan pada pH 8,0 dengan suhu inkubasi 38°C (Felicjaniak, 1986), sementara Jonczyk dan Studniarski (1988) menggunakan enzim yang sama pada kisaran suhu 37,7-42,7 °C dengan pH 7,5-8,5. Brady (1990) menggunakan Pancreatic Trypsin Novo (PTN) pada suhu 32°C dengan pH 8,0. Protease yang berasal dari kapang *Aspergillus niger* digunakan pada suhu 42 °C dengan pH 7,0 dan 9,25 (Malathi *et al.*, 1991; Joseph, 1989). Protease bakteri dihasilkan dari *Bacillus subtilis* diinkubasi pada suhu 45 °C dengan pH 8,0 (Hameed *et al.*, 1996), sedangkan Felicjaniak (1986) melakukan inkubasi pada suhu 30 °C dengan pH 7,2. Penggunaan protease untuk industri penyamakan kulit lazim digunakan pada pH 7,2 sampai 9,25 dengan suhu inkubasi 30-42 °C. Karakter dari protease *Bacillus megaterium* DSM 319 serupa dengan kondisi yang diperlukan untuk industri penyamakan kulit. Protease *Bacillus megaterium* DSM 319 mempunyai aktivitas optimum pada suhu 30 °C dan pH 8. Aktivitas optimum



protease *Bacillus megaterium* DSM 319 sebesar 0,3639 UI/ml dan aktivitas spesifiknya 0,9453 UI/mg.

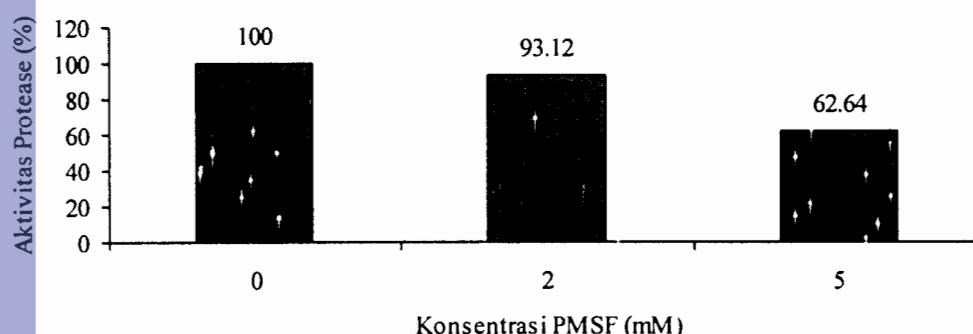
#### Pengaruh Inhibitor EDTA dan PMSF terhadap Aktivitas Protease dari *Bacillus megaterium* DSM 319

Jenis protease dapat ditentukan melalui zat-zat yang menghambat aktivitasnya, zat-zat penghambat ini dikenal sebagai inhibitor. Inhibitor yang umum digunakan untuk mengetahui jenis protease adalah EDTA (Ethylene Diamine Tetra Acetate) dan PMSF (Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride).



Gambar 4 Aktivitas protease *Bacillus megaterium* DSM 319 terhadap EDTA pada Konsentrasi yang Berbeda

Aktivitas protease *Bacillus megaterium* DSM 319 dihambat secara total oleh EDTA pada konsentrasi 5 mM dan sisa aktivitas hanya sebesar 1% dengan adanya EDTA 2 mM (Gambar 4). Penghambatan protease *Bacillus megaterium* DSM 319 oleh EDTA menunjukkan bahwa protease *Bacillus megaterium* DSM 319 merupakan kelompok protease logam atau metaloprotease.



Gambar 5. Aktivitas Protease *Bacillus megaterium* DSM 319 terhadap PMSF pada Konsentrasi yang berbeda

Aktivitas enzim protease *Bacillus megaterium* DSM 319 dihambat sebagian oleh PMSF pada konsentrasi 2 mM dan 5 mM dengan sisa aktivitas sebesar 93,12% dan

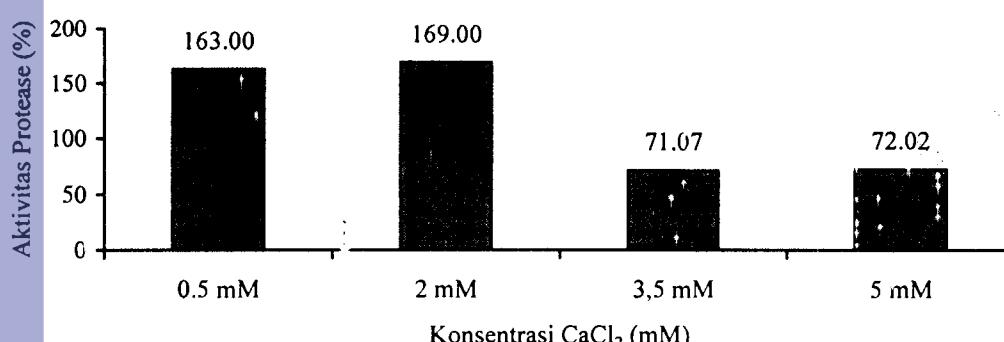


62,64% (Gambar 5). Protease *Bacillus megaterium* DSM 319 aktivitasnya tidak terhambat oleh PMSF, jadi protease ini bukan merupakan kelompok protease serina

### Pengaruh Ion Divalen

Setelah diketahui bahwa protease *Bacillus megaterium* DSM 319 tergolong protease logam atau metaloprotease, maka tindakan yang harus dilakukan adalah mempelajari lebih lanjut mengenai pengaruh ion divalen yang berikatan pada sisi aktif dari protease *Bacillus megaterium* DSM 319 dan pengaruhnya terhadap aktivitas protease itu sendiri.

Penambahan dari logam kalsium ( $\text{CaCl}_2$ ) menyebabkan peningkatan aktivitas enzim sebesar 163% pada konsentrasi 0,5 mM dan 169% pada 2 mM. Pada konsentrasi 3,5 mM dan 5 mM aktivitas enzim yang tersisa ketika enzim ditambahkan dengan  $\text{CaCl}_2$  pada konsentrasi 3,5 mM dan 5 mM dengan sisa aktivitas enzim secara berturut-turut adalah 71,07% dan 72,02% (Gambar 6).

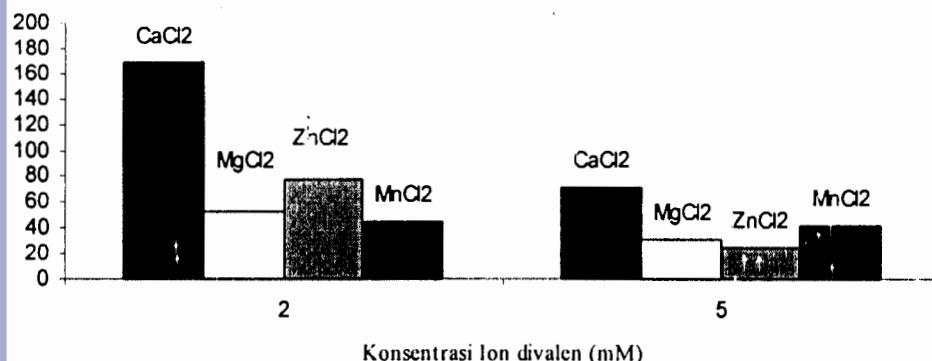


Gambar 6. Aktivitas Protease *Bacillus megaterium* DSM 319 dengan Penambahan  $\text{CaCl}_2$  pada Berbagai Konsentrasi

Protease *Bacillus megaterium* DSM 319 memerlukan ion  $\text{Ca}^{2+}$  agar aktivitasnya dapat berlangsung secara optimal. Fungsi dari logam pada metaloprotease adalah untuk melemahkan ikatan disulfida dari substrat (Beynon, 1989 dalam Harris dan Angal, 1989), sehingga substrat dapat dihidrolisis oleh protease. Logam atau ion divalen, dalam hal ini  $\text{Ca}^{2+}$ , tidak hanya meningkatkan aktivitas enzim tetapi juga membantu mempertahankan kestabilan enzim terhadap panas (Suhartono, 1992). Penambahan kalsium yang terbaik adalah pada konsentrasi 2 mM, dengan menghasilkan aktivitas terbesar.

Selain  $\text{CaCl}_2$ , logam-logam lain yang diujikan adalah  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$  dan  $\text{MnCl}_2$ , tetapi logam-logam ini tidak meningkatkan aktivitas enzim, sebaliknya menurunkan

aktivitas enzim. Penambahan logam-logam lain seperti  $MgCl_2$ ,  $ZnCl_2$ , dan  $MnCl_2$  pada konsentrasi 2 mM, menurunkan aktivitas enzim sehingga aktivitas yang tersisa masing-masing tinggal 31,56%, 76,91% dan 44%. Penurunan yang lebih tinggi dijumpai bila konsentrasi logam-logam ditingkatkan lebih tinggi pada konsentrasi 5 mM (Gambar 7).



Gambar 7. Aktivitas Protease *Bacillus megaterium* DSM 319 dengan Penambahan Ion-Ion Divalen selain Kalsium

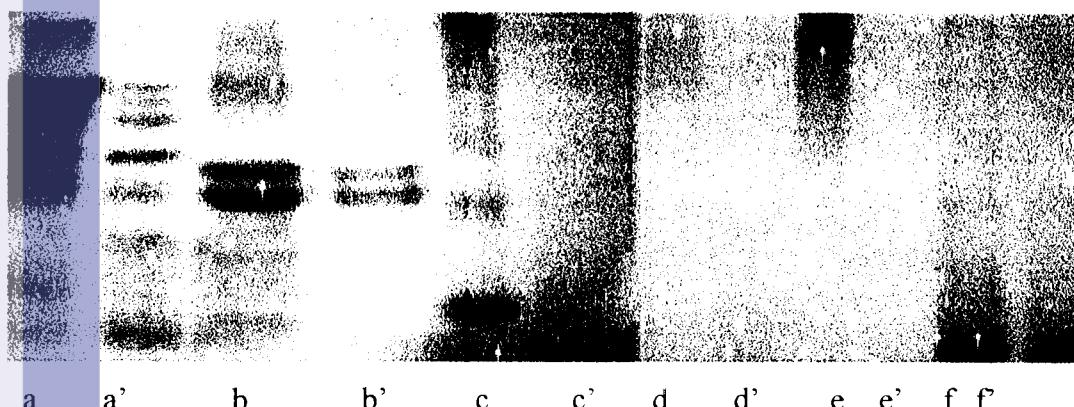
### Pengujian Substrat

Pengujian aktivitas enzim terhadap substrat dengan elektroforesis dilakukan untuk mengetahui kemampuan enzim untuk menghidrolisis substrat BSA, kasein, hemoglobin, kolagen, gelatin dan keratin yang dilambangkan secara berurutan oleh huruf a, b, c, d, e dan f. Hasil elektroforesis yang berupa pita-pita protein seperti disajikan pada Gambar 9. lajur-lajur dengan huruf-huruf tanpa tanda aksen (a, b, c, d, e dan f) terhidrolisis atau tidak oleh enzim. Huruf tanpa tanda aksen adalah substrat-substrat yang belum terhidrolisis atau direaksikan dengan protease *Bacillus megaterium* DSM 319, sedangkan huruf dengan tanda aksen menunjukkan substrat yang telah direaksikan dengan protease.

Pada substrat BSA yang belum direaksikan dengan protease (a), pita biru yang terbentuk menunjukkan berat molekul dari BSA yaitu 66,5 kD. Hasil elektroforesis dari BSA yang telah direaksikan dengan protease terlihat secara jelas bahwa BSA terhidrolisis oleh protease *Bacillus megaterium* DSM 319, yang ditunjukkan oleh warna pita biru oleh BSA pada berat molekul 66,5 kD yang BSA terhidrolisis menjadi protein-protein dengan berat molekul yang lebih ringan atau lebih rendah dari 66,5 kD (a'). Fungsi dari BSA pada kulit adalah sebagai protein transpor di kulit, juga berfungsi sebagai pembawa nutrien bagi rambut pada kulit.

Pada substrat kasein yang belum direaksikan dengan protease (b) terbentuk dua pita biru yang tebal. Dua pita biru pada kasein yang telah direaksikan dengan protease (b') terlihat lebih tipis, ini membuktikan kalau protease *Bacillus megaterium* DSM 319 menghidrolisis kasein. Kasein tidak terdapat pada kulit, hanya terdapat pada susu.

Protease *Bacillus megaterium* DSM 319 juga terbukti menghidrolisis hemoglobin secara baik, ditunjukkan oleh adanya pita-pita biru yang terbentuk oleh protein hemoglobin yang sebelum direaksikan dengan protease (c) dan tidak didapatkan kembali pita-pita biru setelah direaksikan dengan protease (c'). Darah menempel pada kulit bagian bawah, yaitu bagian yang menempel pada otot atau daging. Darah atau hemoglobin jika tidak dibersihkan secara baik akan menyebabkan kerusakan kulit, melalui pengerasan dari kulit.



Keterangan : Protein (a) BSA, (b) Kasein; (c) Hemoglobin, (d) Kolagen, (e) Gelatin, dan (f) keratin.  
Hasil reaksi dengan protease (a') BSA, (b') kasein, (c') hemoglobin, (d') kolagen, (e') gelatin dan (f') keratin.

Gambar 8. Aktivitas Enzim terhadap Berbagai Jenis Protein

Kolagen lajur d pada gambar 9 tidak tervisualisasikan secara jelas karena kolagen mempunyai berat molekul diatas 94 kD ( $\pm$  120 kD) pita biru yang terbentuk hanya kolagen yang dapat larut dalam urea 2%. Namun demikian, hasil visualisasi dengan elektroforesis menunjukan bahwa protease juga dapat menghidrolisis kolagen yang terlarut (d'). Kulit tersusun oleh kolagen, dan sebagian dari kolagen penyusun kulit harus terhidrolisis untuk melemaskan kulit.

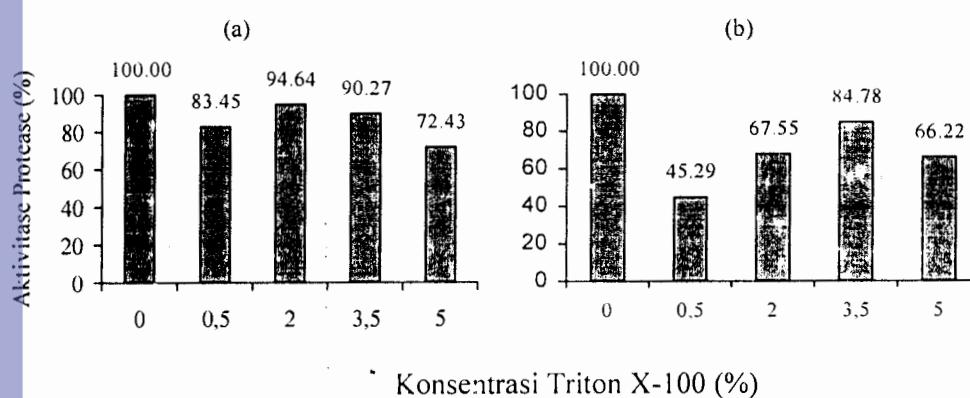
Gelatin seperti hasil visual pada lajur e gambar 9, adalah gelatin yang belum direaksikan dengan protease. Gelatin yang telah direaksikan dengan protease (e') membentuk pita biru, menggambarkan gelatin terhidrolisis oleh protease. Gelatin

adalah bagian kulit yang terlarut, jadi kulit menjadi lebih lemas ketika gelatin terhidrolisis.

Keratin merupakan penyusun utama dari rambut, bulu, wol, sayap, kuku, cakar, duri, sisik, tanduk, kuku kuda, dan kulit penyu (Lehninger, 1982). Keratin tidak dapat dilarutkan, dan hasil visualisasi dengan elektroforesis membuktikan bahwa keratin tidak dihidrolisis oleh protease atau rambut pada kulit setelah perontokkan akan tetap utuh.

### Pengaruh Senyawa Pereduksi dan Deterjen

Langkah pertama sebelum dilakukan SDS-PAGE dan zimogram adalah melakukan pengujian stabilitas enzim terhadap bahan-bahan yang digunakan dalam kedua metode, yaitu SDS (Sodium Dodecyl Sulphate), 2-merkaptetoetanol dan Triton X-100 serta campuran antara SDS dengan Triton X-100. Tujuan dari melakukan pengujian ini adalah untuk mengetahui pengaruh bahan-bahan ini terhadap aktivitas enzim. Bahan-bahan ini digunakan dalam proses elektroforesis. Inkubasi enzim dengan 0,1% SDS diperoleh aktivitas enzim tinggal 92,26%, sedangkan dengan 0,4% SDS adalah sebesar 49,38%. Jadi ketika proses elektroforesis dilakukan kadar maksimal SDS yang diperbolehkan dalam larutan adalah 0,1%. Kadar SDS yang lebih besar akan menurunkan aktivitas enzim sampai 50%.



Gambar 9. Aktivitas Protease *Bacillus megaterium* DSM 319 dengan Penambahan (a). SDS 0,1% dan (b) SDS 0,4% pada Konsentrasi yang Berbeda

Enzim yang telah diinkubasi dengan 0,1% SDS dan ditambah Triton X-100 0,5%, 2%, 3,5% dan 5% masing-masing mempunyai aktivitas sebesar 83,45%, 94,64%, 90,27% dan 72,43% (Gambar 8a). Protease yang diinkubasi dengan 0,4%

SDS dan mengandung Triton X-100 pada konsentrasi 0,5%, 2%, 3,5% dan 5% memiliki sisa aktivitas sebesar 45,29%, 67,55%, 84,78% dan 66,22% (Gambar 8b).

### Penentuan Berat Molekul dengan Zimogram

Berat molekul dari enzim mungkin lebih dari satu tetapi yang tervisualisasi hanya satu yaitu pada berat molekul 67,31 kD. Pada proses zimogram, enzim yang secara spesifik berhenti pada berat molekul tertentu kemudian menghidrolisis substrat yang terlarut pada gel. Protease ini menghidrolisis kasein, atau bersifat kaseinolitik, sudah dapat digunakan untuk melepaskan rambut dari kulit (Malathi *et al.*, 1991). Hasil visualisasi berat molekul enzim dengan zimogram (Gambar 10). Zimogram merupakan teknik yang digunakan untuk melihat berat molekul dari enzim secara spesifik, yaitu enzim yang menghidrolisis substrat tertentu, dalam hal ini kasein. Protease dari *Bacillus megaterium* DSM 319 menghidrolisis kasein pada berat molekul 67,31 kD.



Gambar 10. Penentuan Berat Molekul Protease *Bacillus megaterium* DSM 319 pada Substrat Kasein dengan Metode Zimogram

### Aplikasi Protease pada Kulit

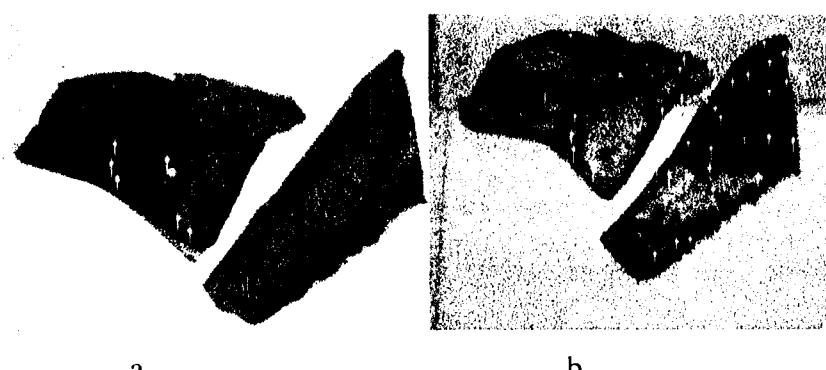
Aplikasi pengujian enzim terhadap kulit dilakukan untuk melengkapi karakterisasi dengan tujuan melihat kerontokan rambut dari kulit sapi yang digunakan. Kulit yang digunakan adalah kulit paha sapi dengan ukuran 309,75 cm<sup>2</sup> dan 232,25 cm<sup>2</sup> dengan berat keduanya 63,4 g diperoleh dari Rumah Potong Hewan Bogor. Kulit diinkubasi dengan protease sebanyak 5% dari berat kulit pada suhu 30 °C dan pH 8 selama 2 jam dalam penangas bergoyang (shaker) (4 rpm). Setelah itu, kulit dicuci dengan aquades dan direndam dalam buffer pada suhu dan pH yang sama



selama satu malam. Selanjutnya, untuk melepaskan rambut dilakukan pengerkokan, karena ternyata rambut tidak rontok dengan sendirinya.

Pengujian enzim pada kulit menunjukkan hasil yang positif, rambut pada kulit sapi terlihat rontok. Rambut dapat terlepas dengan mudah, tetapi karena penyebaran dari enzim yang tidak merata, maka kulit yang benar-benar rontok hanya pada beberapa tempat saja (Gambar 12 b). Kerontokkan rambut kurang lebih berkisar dari 15% sampai 53%. Penyebaran protease yang tidak merata ini disebabkan karena kulit tidak teraduk secara merata seperti pada proses penyamakan kulit dengan menggunakan drum. Pada aplikasi ini kulit hanya diletakkan pada wadah plastik, kemudian selama proses inkubasi kulit hanya digoyang saja. Kulit yang mengalami persentase kerontokan terbesar ( $\pm 53\%$ ), mempunyai posisi yang terendam dengan baik dibanding dengan kulit dengan persentase kerontokan lebih kecil ( $\pm 15\%$ ). Proses ini sudah dapat membuktikan bahwa protease yang dihasilkan oleh *Bacillus megaterium* DSM 319 terbukti merontokkan rambut pada kulit. Pada pengujian, kulit hanya diperlakukan dengan enzim secara langsung, tanpa Na<sub>2</sub>S.

Persentase protease yang digunakan adalah 5%, lebih banyak dari jumlah yang biasa digunakan ( $\pm 2,5\%$ ) karena preparasi protease sudah berumur tiga bulan, sehingga diasumsikan sudah mengalami penurunan aktivitas dari protease yang baru diproduksi. Perbedaan hasil yang diperoleh juga disebabkan oleh perbedaan alat yang digunakan, pada penelitian alat yang digunakan adalah penangas bergoyang, dengan kecepatan 4 rpm sedangkan pada industri kulit menggunakan drum dengan kecepatan 7 rpm.



Gambar 11. Aplikasi Protease *Bacillus megaterium* DSM 319 sebagai Agensi Pelepas Rambut (a) Kulit sebelum Perlakuan dan (b) Kulit setelah Perlakuan



- KESIMPULAN DAN SARAN**
- Kesimpulan**
- 1) Protease asal *Bacillus megaterium* DSM 319 mempunyai karakter :
    - a. suhu aktivitas antara 30 °- 45 °C, dengan suhu optimum pada suhu 30 °C
    - b. nilai pH antara 6-8, dengan pH optimum pada pH 8
    - c. aktivitas protease dihambat secara total oleh EDTA, namun distimulasi oleh ion divalen kalsium ( $\text{Ca}^{2+}$ )
    - d. menghidrolisis kasein, hemoglobin, albumin (BSA), gelatin dan kolagen, dan berat molekul sebesar 67,31 kD
  - 2) Berdasarkan karakter tersebut maka protease *Bacillus megaterium* DSM 319 dikelompokkan sebagai protease logam.

**Saran**

Perlu ada penelitian lanjutan mengenai penerapan dari protease ini, sehingga dapat digunakan secara lebih efisien dan efektif,diantaranya:

- a. pengaruh pemanasan dari enzim pada proses pemanasan dalam metode zimogram sehingga dapat diperoleh visualisasi yang lebih baik dari enzim.
- b. mempelajari konsentrasi enzim yang tepat untuk pelepasan rambut, serta kualitas kulit yang dihasilkan, pada proses penyamakan kulit dengan menggunakan protease *Bacillus megaterium* DSM 319.



## DAFTAR PUSTAKA

- Anwar, A. and M. Saleemuddin. 1998. Alkaline Protease: A Review. *Bioresource Technology* 64: 175-183.
- Beynon, M. J. 1989. Eleltrophoretic Analysis Methods. In: Harris, E. L. V. and S. Angal (Eds.). *Protein Purification Methods*. IRL Press. Oxford University Press. Oxford, United Kingdom.
- Bradford, M. M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantitaties of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dya Binding Analitical Biochemistry 72: 248-254.
- Budiasih-Wahyuntari, B. 2001. Pemurnian dan Karakterisasi Protease Ekstraseluler Isolat Prokariot Termofilik Ekstrim dari Tangkuban Perahu. Program Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Chaplin, M.F. and C. Bucke. 1990. *Enzyme Technology*. Cambridge University Press. Cambridge, United Kingdom.
- Cromogenia Units. 1995. Ecology in The Beamhouse. *Leather International Journal of The Industry*. 7: 37-39.
- Feigel, T. 1995. How The Process Steps Influence Quality and The Enviroment. *Leather International Journal of The Industry*. 3: 81-90.
- Felicjaniak, B. 1986. Studies on Enzymatic Unhairing: Part I. The Influence of Pigskins Alkalisation on Destruction of Skin Grain During Depilation with Pancreatic Enzymes. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*. 69: 160.
- Felicjaniak, B. 1986. Studies on Enzymatic Unhairing: Part II. The Influence of Alkalisation on the Destruction of Grain of Pigskins Depilated with A Bacterial Enzymatic Preparation. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*. 69: 164.
- Garfin, D.E. 1990. Onc-Dimensional Gel Electrosresis. In: *Methods In Enzymology*, Vol. 182. Academic Press, Inc. New York.
- Ginting, R. 2000. Kemungkinan Pemanfaatan Pankreas Domba sebagai Bahan Bating pada Pembuatan Kulit Samak Kras Kambing. Skripsi. Ilmu Produksi Ternak. Fakultas Peteriakan. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Hameed, A., M.A. Natt and C.S. Evans. 1996. Short Communication: Production of alkaline protease by a new *Bacillus subtilis* isolate for use as a bathing enzyme in leather treatment. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 12: 289-291.
- Hudiyono P.W.S., S. 1998. Teori Dasar Enzim. Diktat Kuliah. Jurusan Kimia. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Indonesia. Jakarta.
- Jonczyk, W and K. Studniarski. 1988. Enzyme Unhairing of Pigskins. *Journal of the Society of Leather Technologist and Chemists*. 72: 83-88.



Joseph, K. T. 1989. Biotechnologies for Beam House Operation. Journal of Indian Leather Technologists Association. 5:157-162.

Judoamidjojo, R. M. 1974. Dasar Teknologi dan Kimia Kulit. Departemen Teknologi Hasil Pertanian. Fakultas Teknik dan Mekanisasi Pertanian. Institut Pertanian Bogor. Bogor.

Karyadi, D., Prayitno dan Sulistiayah. W. 1996. Teknologi Akrab Lingkungan pada Industri Penyamakan Kulit. Buletin Sains dan Teknologi Kulit. No. 5, Th.V, 63-73.

Lehninger, A.L. 1982. Dasar-dasar Biokimia. Jilid 1.Terjemahan. M. Thenawidjaya. Erlangga. Jakarta.

Malathi. S. and R. Chakraborty. 1991. Production of Alkaline Protease by a New *Aspergillus flavus* Isolate under Solid-Substrate Fermentation Conditions for Use as a Depilation Agent. Applied and Environmental Microbiology 57: 712-716.

Malathi, S., R. Chakraborty, K. Parthasarathi, B. Ramaniah, K. B. Gupta and R. B. Mitra. 1991. A Cost-Effective Method for the Production of Alkaline Protease by An *Aspergillus flavus* Isolate And Its Application for the depilation of Goat Skins. Journal of American Leather Chemists Association, 86:33-41.

Muchtadi, D. , N. S. Palupi dan M. Astawan. 1992. Enzim dalam Industri Pangan. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi. Pusat Antar Universitas Bioteknologi. Institut Pertanian Bogor, Bogor.

Palmer, T. 1991. Understanding Enzymes. 3<sup>rd</sup>. Ed. Ellis Horwood. England.

Puvanakrishnan, R and S. C. Dhar. 1988. Enzyme Technology in Beamhouse Practice. Central Leather Research Institute. Madras, India.

Rao, M. B., A.M. Tanksale, M. S. Ghatge, and V.V. Deshpande. 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. Microbiology. Molecular Biology. Review. 9: 597-635.

Rodwell, V. W. 1981. Harper's Review of Biochemistry 18<sup>th</sup>. Ed. Lange Medical Publications. Los Altos, California.

Sanusi, H. S., M.S. Saeni, D. S. Sjafei dan A. Kastry. 1981. Kemampuan Purifikasi Alamiah Sungai Ciliwung terhadap Pengotoran Air Limbah Pabrik Penyamak Kulit. Departemen Biologi Perairan. Fakultas Perikanan. Institut Pertanian Bogor, Bogor.

Stanley, A. 1994. Cleaner Contribution of Enzymes. Leather International Journal of The Industry. 2: 43-48.

Stauffer, C. E. 1989. Enzyme Assays for Food Scientists. Van Nostrand Reinhold. New York.

Suhartono, M.T. 1992. Protease. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi. Pusat Antar Universitas Bioteknologi. Institut Pertanian Bogor, Bogor.



- Walter, H.E. 1988. Methods with haemoglobin, casein, and azosoll as substrate. In: H.U. Bergmeyer, J. Bergmeyer and M. Garßl. Methods of Enzymatic Analysis. 3<sup>rd</sup> Ed. Verlag Chemic, Weinheim. German.
- Waltam, D.S. 1997. Produksi enzim protease dari *Bacillus megaterium* DSM 319 menggunakan media lokal. Proceeding of The 1<sup>st</sup> Conference Industrial Enzyme and Biotechnology. Jakarta. pp. 233-237.
- Winarno, F.G. 1995. Enzim Pangan. Penerbit PT Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.



Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

## **LAMPIRAN**

## Lampiran 1. Bahan-bahan untuk Aktivitas Enzim Metode Walter (1988) yang Dimodifikasi (Wahyuntari, 2001)

Pembuatan Trichloro acetate acid (TCA) dilakukan dengan melarutkan 1,8 g TCA dalam 100ml aquades

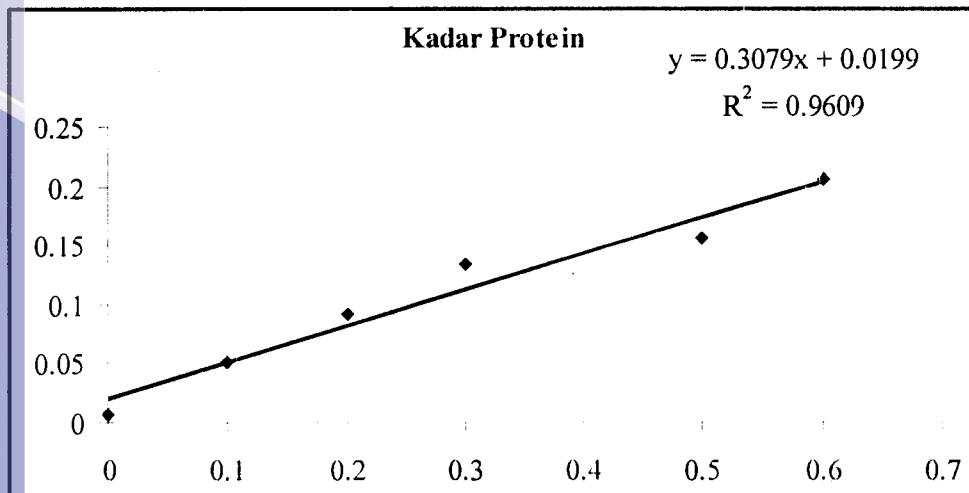
Pembuatan Folin (2:1) dilakukan dengan melarutkan Folin-Ciocealteu's phenol reagent 10 ml ke dalam aquades 20 ml. Larutan disimpan dalam wadah berwarna gelap untuk kestabilan larutan setelah atau saat tidak dipakai dan harus disimpan dalam kulkas. Lebih dalam keadaan segar setiap akan digunakan.

Pembuatan tirosin 5 mM dilakukan dengan menimbang L-Tyrosine sebanyak 0,0453 g/50 ml. Tirosin dilarutkan dalam aquades 20-30 ml, kemudian ditambahkan 1 tetes NaOH 10 M. Setelah larut seluruhnya, larutan tirosin dikondisikan menjadi pH 9 dengan menambahkan HCl 0,1 N, kemudian ditambahkan larutan buffer pH 9 sampai 50 ml.

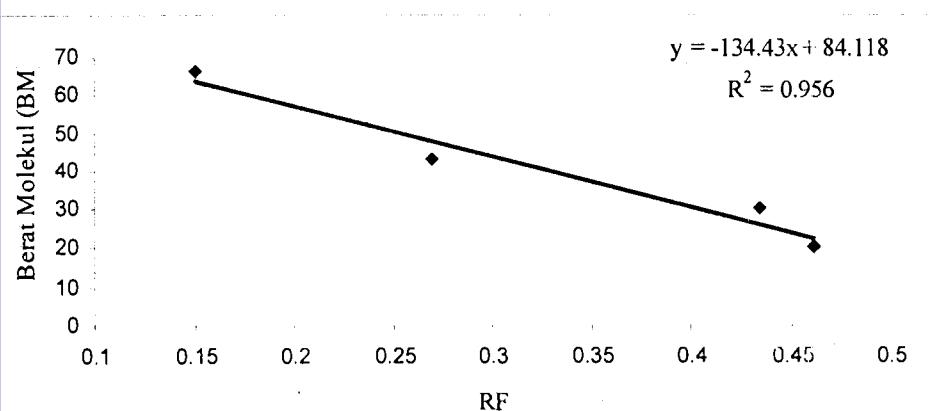
Buffer Universal dibagi menjadi dua bagian yaitu larutan A dan larutan B. Larutan A dibuat dengan melarutkan asam sitrat 6,008 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3,893 g,  $\text{H}_2\text{BO}_3$  1,769 g dan asam dietilbarbiturat 5,266 g dengan aquades sampai volumenya mencapai 1 liter. Larutan B dibuat dengan melarutkan NaOH 0,8 g dalam 100 ml aquades. Larutan bufer universal yang dikehendaki dapat dibuat dengan melarutkan 100 ml larutan A dan menambahkan sedikit demi sedikit larutan B hingga pH yang dikehendaki.

Bufer Tris-HCl, tersusun dari larutan Tris (hidrosimetil) aminometana dan larutan HCl 0,2 M. Larutan Tris (hidrosimetil) aminometana dibuat dengan menimbang senyawa tersebut 24,2 g lalu melarutkannya dalam 1000 ml aquades. Larutan bufer diperoleh dengan mencampurkan larutan Tris dengan larutan HCl sampai pH yang diinginkan.

Lampiran 2. Kurva Standar Bradford



Lampiran 3. Persamaan dari Marker Zimogram





#### Lampiran 4. Bahan-bahan untuk SDS-PAGE

Bahan-bahan untuk SDS-PAGE terdiri dari larutan A, B, C dan ammonium sulfat. Larutan A dibuat dengan melarutkan akrilamid 29,2 g dan bis-akrilamid 0,8g dalam aquades 100ml. Selama pengadukan, larutan akrilamid ini harus ditutup oleh parafilm sampai bahan-bahan larut secara keseluruhan. Larutan ini beracun dan bersifat neurotoxin. Larutan ini dapat disimpan dalam wadah kedap sinar selama sebulan dalam lemari es.

Larutan B atau gel pemisah 4x dibuat dengan melarutkan Tris-HCl (pH 8,8) 75 ml, SDS (10%) 4 ml dalam aquades 21 ml. Larutan ini dapat disimpan dalam lemari es selama sebulan.

Larutan C atau gel penahan 4x dibuat dengan melarutkan Tris-HCl (pH6,8) 50 ml, SDS (10%) 4 ml dalam 46 ml H<sub>2</sub>O. Larutan ini tahan disimpan dalam lemari es selama sebulan.

Larutan 10% Amonium sulfat dibuat dengan melarutkan ammonium sulfat 0,5 g dalam aquades 5 ml. Larutan ini stabil dalam wadah tertutup dalam lemari es selama sebulan.

Buffer elektroforesis dibuat dengan melarutkan Trisma-Baze 3 g, glisin 14,4 g, SDS (10%) 1 g dan ditambahkan air hingga volumenya mencapai 1 liter. Larutan ini mempunyai pH akhir sekitar 8,3. Larutan ini disimpan dalam lemari es.

Sampel buffer 5x dibuat dengan melarutkan Tris-HCl 1M (pH 6,8) 0,6 ml, gliserol (50%) 5 ml, SDS (10%) 2 ml, 2-mercaptoetanol 0,5 ml, bromofenol biru (1%) 1ml dalam aquades 0,9 ml. Larutan ini stabil selama seminggu dalam lemari es dan selama sebulan di *freezer*.

