

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI YANG BERPOTENSI SEBAGAI  
PENGHASIL ENZIM PROTEASE PADA INDUSTRI PENYAMAKAN  
KULIT PT. ADHI Satria ABADI (ASA), YOGYAKARTA**

**Isolation and Identification of Bacteria that Has Potential as Producer of Protease  
Enzyme in the Tannery Industry, PT. Adi Satria Abadi (ASA), Yogyakarta**

M. I. Said dan J. C. Likadja

Laboratorium Teknologi Hasil Ternak  
Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin  
Jl. Perintis Kemerdekaan Km. 10 Makassar 90245  
email : irfanmks@yahoo.com

**ABSTRACT**

Bacteria are one of the microorganisms that have the potential as a producer of protease enzyme. Tannery industrial waste is one of the media predicted to contain a number of proteolytic bacteria because of the waste generated is composed largely of protein and fat which are good as growing medium for bacteria. This study aimed to isolate and identify bacteria that have the potential as a producer of protease enzyme. Research conducted at the waste water processing installation (WWPI), tannery industry of PT. Adi Satria Abadi (ASA), Sitemulyo, Bantul, Yogyakarta and Laboratory of Animal Product and Food, Faculty of Animal Science, Gadjah Mada University, Yogyakarta. Solid waste (SW), waste water (WW) and soil (S) around the industry are used as source of isolates. Random screening methods used for isolation and identification. The results obtained by isolation and identification of 1264 colonies (621 colonies from the SW, 156 of the WW and 487 of S). Thirty one colonies (2.5%) were identified as potentially proteolytic bacteria by the presence of clear zone (halo) around the colony while the 1.233 colonies (97.5%) were not potential. The third colony isolates look like a white crust, firmly attached to the medium, round, white to resemble wool and convex. Bacterial isolates from the S and SW at pH 10 and 12 were potential as a source of proteases with Proteolytic Index (PI)  $\geq 3$ , while the one isolated from WW was less potential.

**Keywords** : Bacteria, Protease enzyme, Tannery industry waste, Clear zone, Proteolytic index

**ABSTRAK**

Bakteri merupakan salah satu mikroorganisme yang berpotensi sebagai penghasil enzim protease. Limbah industri penyamakan kulit merupakan salah satu media yang diduga mengandung sejumlah bakteri proteolitik karena limbah yang dihasilkan sebagian besar terdiri atas protein dan lemak yang merupakan media tumbuh yang baik untuk bakteri. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri yang berpotensi sebagai penghasil enzim protease. Penelitian dilaksanakan di Instalasi Pengolah Air Limbah (IPAL), industri penyamakan kulit PT.

Adhi Satria Abadi (ASA), Sitimulyo, Bantul, Yogyakarta dan Lab. Pangan Hasil Ternak, Fak.Peternakan UGM. Limbah Padat (LP), Limbah Cair (LC) dan tanah (T) sekitar industri digunakan sebagai sumber isolat. Proses isolasi dan identifikasi menggunakan metode *screening random*. Hasil isolasi dan identifikasi diperoleh 1.264 koloni (621 koloni dari LP, 156 dari LC dan 487 dari T). Sebanyak sekitar 31 koloni (2,5%) diidentifikasi berpotensi sebagai bakteri proteolitik yang ditandai adanya zona bening (halo) disekitar koloni dan sisanya 1.233 koloni (97,5%) tidak berpotensi. Koloni ketiga isolat tampak seperti kerak putih, melekat erat pada medium, bulat, putih dengan tepian menyerupai wol serta cembung. Isolat bakteri dari T dan LP pada pH 10 dan 12 berpotensi sebagai sumber protease dengan Indeks Proteolitik (IP) $\geq$ 3 sedangkan dari LC kurang berpotensi.

**Kata Kunci :** Bakteri, Enzim protease, Limbah industri penyamakan kulit, Zona bening, Indeks proteolitik

## PENDAHULUAN

PT.Adhi Satria Abadi merupakan salah satu industri penyamakan kulit di Provinsi DI.Yogyakarta yang setiap harinya mengolah kulit mentah menjadi kulit jadi (*leather*). Industri penyamakan kulit dalam prosesnya melibatkan sejumlah aktivitas, baik fisik, kimiawi maupun biologis. Adanya aktivitas biologis dalam hal ini cemaran mikroorganisme tentunya memiliki pengaruh yang sangat besar baik bagi karyawan pada industri tersebut maupun terhadap masyarakat yang ada disekitarnya. Penelitian menunjukkan bahwa kulit-kulit yang disimpan maupun diproses pada industri penyamakan kulit telah banyak yang ditumbuhi oleh mikroorganisme baik yang bersifat patogen maupun yang tidak (Said, 2000).

Salah satu aktivitas biologis pada limbah penyamakan kulit yang memiliki pengaruh terhadap industri maupun lingkungannya adalah adanya kemungkinan terjadinya cemaran mikroorganisme khususnya bakteri. Mengingat limbah penyamakan kulit sebagian besar terdiri atas protein, lemak dan air, maka potensi untuk menjadi media tumbuh bakteri sangatlah besar. Bakteri yang tumbuh pada limbah tersebut tentunya tidak semuanya memberikan dampak negatif, namun juga beberapa diantaranya memberikan dampak positif yang memungkinkan dapat dimanfaatkan untuk kemaslahatan manusia.

Salah satu dampak positif dari bakteri adalah potensinya sebagai sumber enzim protease (Suhartono, 2000). Penggunaan enzim protease dalam berbagai produk komersial semakin meluas sejalan dengan kemajuan dalam bidang bioteknologi. Enzim protease banyak dimanfaatkan dalam bidang industri penyamakan kulit, pengolahan pangan, industri deterjen, tekstil, makanan, hidrolisat protein, pengolahan susu, farmasi, makanan, bir, film maupun processing limbah (Moon dan Parulekar 1993). Mikroorganisme merupakan salah satu sumber enzim yang paling potensial dibandingkan tanaman dan hewan. Penggunaan mikroorganisme lebih menguntungkan karena pertumbuhannya cepat, dapat tumbuh pada substrat yang murah, lebih mudah ditingkatkan hasilnya melalui pengaturan kondisi pertumbuhan dan rekayasa genetik, serta mampu menghasilkan enzim yang ekstrim. Keberadaan mikroorganisme yang unggul merupakan faktor penting dalam proses produksi enzim

secara massal, sehingga upaya untuk mencari mikroorganisme indigenous sebagai penghasil protease sangat perlu dilakukan di Indonesia. Keragaman hayati yang tinggi memberikan peluang yang besar untuk mendapatkan mikroorganisme yang potensial untuk dikembangkan sebagai penghasil enzim (Akhdiya, 2003).

Penelitian-penelitian yang berkaitan dengan karakteristik mikroorganisme khususnya bakteri yang berpotensi sebagai penghasil enzim protease dari limbah penyamakan kulit belum banyak dipublikasikan sehingga hal ini sangat menarik untuk dikaji secara lebih mendalam. Salah satu tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri yang berpotensi sebagai penghasil enzim protease dari limbah industri penyamakan kulit PT.Adhi Satria Abadi (ASA), Yogyakarta.

## MATERI DAN METODE

### Lokasi penelitian

Penelitian dilaksanakan di Unit Instalasi Pengolah Air Limbah (IPAL) Industri Penyamakan Kulit PT. Adhi Satria Abadi (ASA), Sitimulyo, Bantul, Yogyakarta. Proses isolasi dan identifikasi bakteri dilaksanakan di Laboratorium Laboratorium Pangan Hasil Ternak, Fakultas Peternakan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

### Bahan dan alat

Materi utama penelitian ini adalah limbah proses penyamakan kulit berupa Limbah Padat (LP), Limbah Cair (LC) yang diperoleh dari IPAL industri penyamakan kulit PT.ASA serta Tanah (T) di sekitar industri tersebut. Bahan-bahan lain yang digunakan antara lain : yeast ekstrak (*oxoid*), nutrien agar (NA), susu skim, NaCl 9% (*oxoid*), buffer universal (pH 8, 10 dan 12), larutan kasein 2,5% (*E.Merck*) dan alkohol 70%.

Peralatan dalam proses isolasi dan identifikasi bakteri proteolitik adalah autoklaf (*sterilizer all America*), Laminar Air Flow (*Telstar B10-11A/P*), oven (*memmert*), water bath (*Riko RS-12TE*), Vortex (*16700 Mixer, Maxi-Mix*), sentrifuge (*Sorval Biofuge Stratos*), makro/mikropipet (*socorex*), pH meter (*Toa pH meter HM-5S*), timbangan (*Acculab VI-200*), stirrer (*Cimarec 3*), tabung reaksi, tabung durham, jarum ose, pipet tetes, petridish, mikroskop (*Nikon eclipse E 600*), erlenmeyer, kaca preparat dan lampu bunsen.

### Pelaksanaan penelitian

Proses isolasi dan identifikasi mikroba menggunakan metode *screening random* menurut Malathi dan Chakraborty (1991). Sampel LC disaring memakai kertas whatman, sedangkan T dan LP diencerkan menggunakan aquades steril. Inkubasi menggunakan suhu 37°C selama 24 jam dalam inkubator bergoyang.

Isolasi dilakukan dengan menggunakan medium nutrient agar (NA) yang mengandung kasein dan diperkaya dengan *skim milk*. Kasein yang merupakan substrat yang baik untuk mengisolasi bakteri penghasil enzim protease dan

menginduksi sintesis enzim protease alkalin (Ward, 1983 ; Fujiwara dan Yamamoto, 1987).

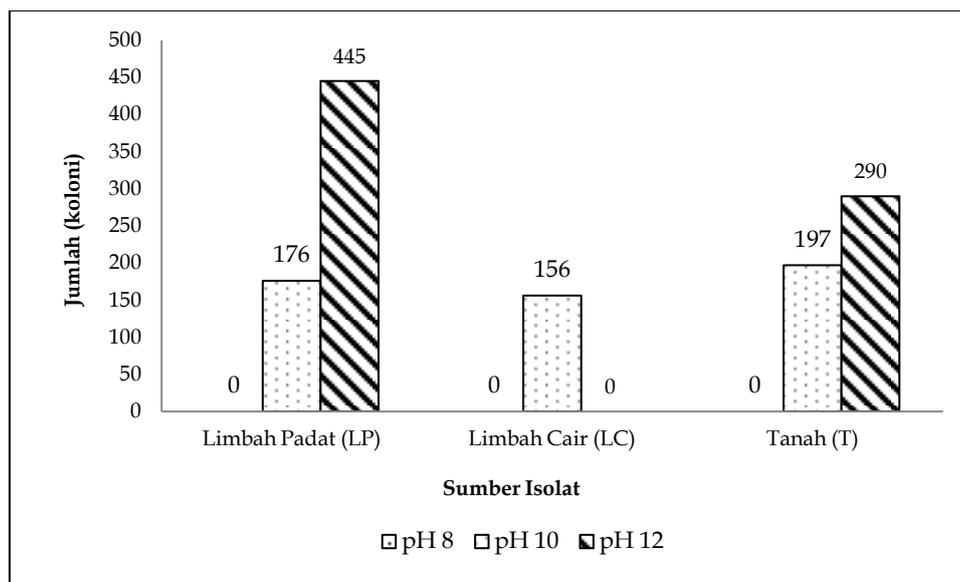
Medium dengan pH 8, 10 dan 12 yang telah dipersiapkan dituangkan ke dalam petridish yang telah disterilisasi sebanyak 10-15 ml dan dibiarkan memadat. Pengenceran dilakukan sampai  $10^{-8}$ , kemudian dilakukan inokulasi pada medium yang telah disiapkan (Thangam *et al.*, 2001). Tahap identifikasi bakteri meliputi pengamatan morfologi (zona bening dan diameter koloni) serta kemampuan tumbuh pada berbagai jenis tingkatan pH (Lay, 1989).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Karakteristik isolat pada sumber dan pH berbeda

Hasil identifikasi terhadap jumlah isolat bakteri yang ditemukan pada berbagai jenis sumber dengan kondisi pH berbeda selengkapnya disajikan pada Gambar 1.

Berdasarkan Gambar 1 terlihat bahwa pada proses *screening* awal dengan sumber isolat dan kondisi pH media tumbuh berbeda telah diperoleh 1.264 koloni, yang terdiri atas 621 koloni dari sumber isolat LP, 156 dari sumber LC dan 487 dari sumber T. Berdasarkan data tersebut menunjukkan bahwa koloni bakteri paling banyak ditemukan pada LP. Kondisi pada pH 12 menunjukkan bahwa jumlah koloni yang berasal dari sumber LP jumlahnya lebih besar dibanding yang berasal dari T. Hal ini kemungkinan disebabkan karena LP pada dasarnya adalah limbah hasil proses dari LC yang telah melewati perlakuan biologi, sehingga memberi kesempatan kepada mikrobia untuk mengkonsumsi padatan terlarut dan koloid agar dapat tumbuh dan berkembang biak membentuk *floks* (Triatmojo, 2004). Hal tersebut menyebabkan jumlah bakteri pada LC sudah banyak yang mengalami in-aktivasi oleh adanya perlakuan biologi tersebut sehingga populasinya menjadi lebih rendah.



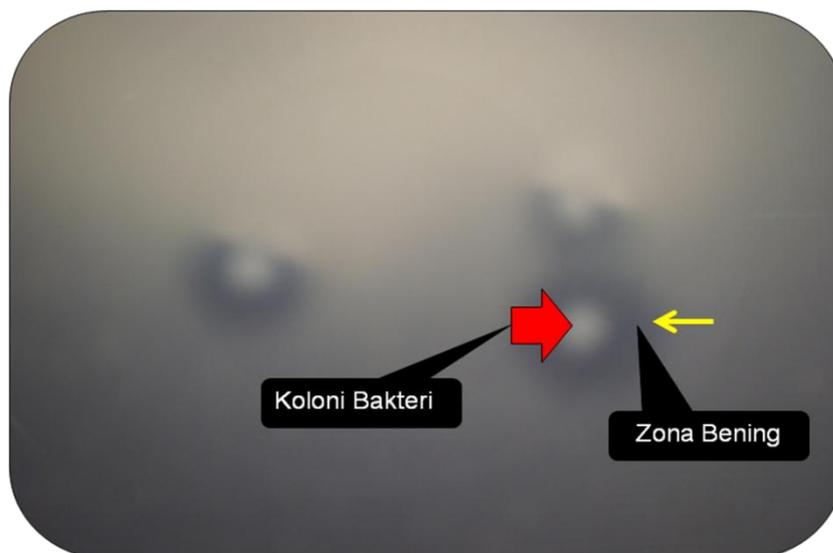
**Gambar 1.** Karakteristik jumlah isolat (koloni) bakteri yang ditemukan dan mampu tumbuh pada berbagai sumber dengan kondisi pH berbeda

Pengaturan media pertumbuhan bakteri pada berbagai jenis pH sangat penting untuk mengetahui pada kondisi pH berapa bakteri akan beraktivitas secara maksimal, karena menurut Lehninger (2008) bahwa aktivitas katalitik enzim di dalam sel dipengaruhi oleh perubahan pH medium lingkungan.

### Morfologi isolat bakteri penghasil protease

Morfologi isolat bakteri proteolitik yang memiliki potensi sebagai penghasil enzim protease secara jelas ditampilkan pada Gambar 2.

Berdasarkan Gambar 2 terlihat bahwa secara morfologi isolat bakteri yang ditemukan melekat erat pada medium, bentuknya bulat, berwarna putih dengan tepian menyerupai wol, berbentuk cembung seperti kerak putih. Berdasarkan hasil uji katalase dan  $\text{NO}_3$ , isolat dari ketiga sumber tersebut menunjukkan reaksi positif. Pembentukan zona bening disekeliling isolat pada medium kasein merupakan salah satu indikator untuk menentukan adanya aktivitas proteolitik dari suatu organisme bakteri. Menurut Bower (1992) bahwa kasein merupakan kelompok phosphoprotein yang diketahui secara kolektif jumlahnya 80% dari protein skim. Kasein adalah protein yang mengalami presipitasi dari skim susu pada pH 4,6 dan suhu  $20^\circ\text{C}$  ( $68^\circ\text{F}$ ). Indikasi hidrolisis kasein adalah terbentuknya zona bening (halo) yang mengelilingi koloni pada plat setelah proses inkubasi dilakukan.

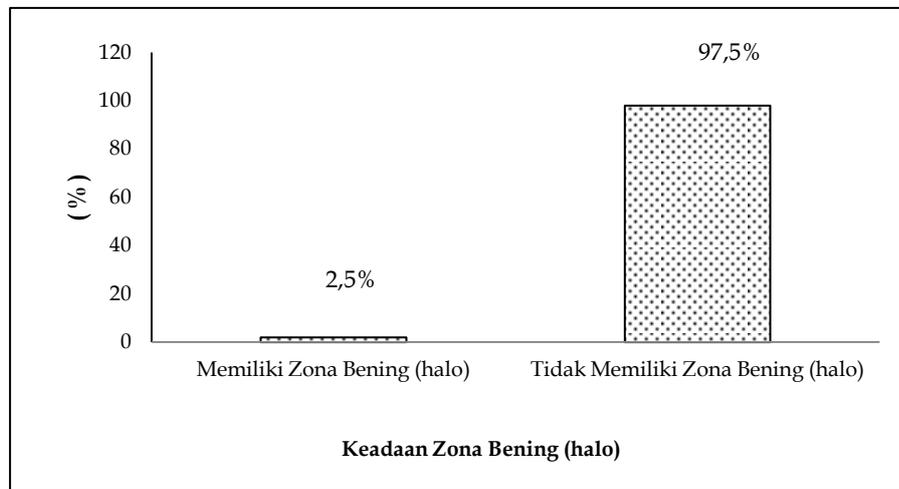


**Gambar 2.** Morfologi isolat bakteri proteolitik yang berpotensi sebagai penghasil enzim protease

Dari keseluruhan isolat bakteri yang ditemukan setelah dilakukan identifikasi ternyata tidak semua isolat bakteri berpotensi sebagai penghasil enzim protease. Gambaran perbandingan populasi isolat bakteri yang mampu menghasilkan enzim protease dengan isolat bakteri yang tidak mampu menghasilkan enzim protease secara lengkap disajikan pada Gambar 3.

Berdasarkan Gambar 3 terlihat bahwa koloni yang memiliki zona bening dengan koloni yang tidak memiliki zona bening (halo) perbedaannya sangat signifikan. Dari 1.264 koloni isolat bakteri yang teridentifikasi awal, hanya sekitar 2,5% (31 koloni)

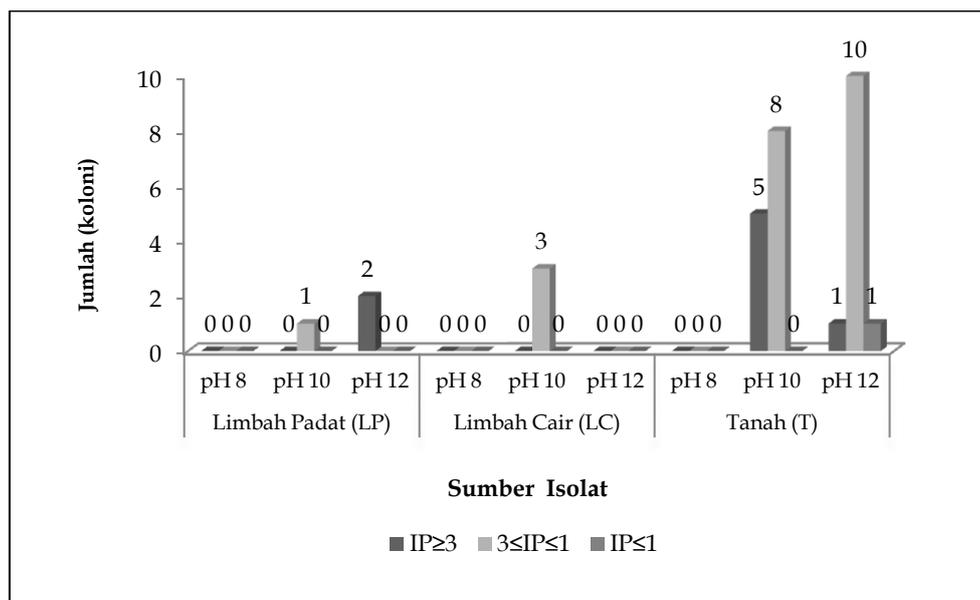
yang memiliki zona bening sedangkan sisanya 97,5% (1.233 koloni) tidak memiliki zona bening. Hal ini berarti bahwa hanya sekitar 2,5% yang memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai bakteri proteolitik.



**Gambar 3.** Perbandingan jumlah isolat (koloni) bakteri yang memiliki dan tidak memiliki zona bening pada berbagai sumber isolat dengan kondisi pH berbeda

### Indeks proteolitik (IP) isolat bakteri penghasil protease

Indeks Proteolitik (IP) merupakan ukuran yang menunjukkan nisbah antara diameter zona bening terhadap diameter koloni (Durham *et al.*, 1987). Nilai IP yang semakin tinggi ( $\geq 3$ ) pada isolat menunjukkan bahwa isolat tersebut memiliki potensi yang sangat besar dan maksimal sebagai sumber protease. Karakteristik nilai IP isolat bakteri dari beberapa sumber dan pH berbeda selengkapnya disajikan pada Gambar 4.



**Gambar 4.** Nilai indeks proteolitik (IP) isolat bakteri dari sumber dan pH berbeda

Berdasarkan Gambar 4 terlihat bahwa isolat yang memiliki nilai IP  $\geq 3$  ditemukan pada sumber isolat LP dan T yakni masing-masing 2 dan 6 isolat sedangkan dari sumber LC potensinya masih sangat rendah (IP $\leq 3$ ). Tingginya IP pada isolat-isolat yang ditemukan pada LP dapat disebabkan karena, pada LP komponen senyawa protein dan lemak masih sangat tinggi sebagai hasil processing dari kulit. Menurut Sarkar (1995), bahwa kulit secara struktural mengandung 33% protein dan 2-3% lemak yang merupakan media tumbuh yang sangat potensial bagi mikroorganisme khususnya bakteri.

Nilai IP yang tinggi pada isolat yang bersumber dari T (tanah) disebabkan karena tanah masih mengandung banyak senyawa-senyawa protein yang merupakan hasil dekomposisi makhluk hidup untuk selanjutnya dimanfaatkan oleh bakteri sebagai sumber nutrient bagi kehidupannya. Bakteri merupakan suatu katalisator biologi yang dapat mengoksidasi amoniak ke nitrat. Jika material nitrogen dalam bentuk protein dari limbah maupun pupuk senantiasa tersedia, maka aktivitas katalisator bakteri tersebut akan senantiasa meningkat (Nasahi, 2010). Aktivitas proteolitik dipengaruhi oleh pH karena sifat ionik gugus karboksil dan gugus amino mudah dipengaruhi oleh pH. Perubahan nilai pH ataupun kondisi pH yang tidak sesuai dengan lingkungannya akan menyebabkan daerah katalitik dan konformasi enzim berubah. Selain itu terjadinya perubahan pH juga dapat menyebabkan terjadinya proses denaturasi enzim dan pada akhirnya akan mengakibatkan hilangnya aktivitas dari enzim tersebut (Girindra, 1993). Profil aktivitas pH dari suatu enzim menggambarkan pH pada saat gugus pemberi atau penerima proton yang penting pada sisi katalitik enzim berada dalam tingkat ionisasi yang diinginkan (Baehaki *dkk.*, 2011).

## KESIMPULAN

Bakteri proteolitik telah berhasil diisolasi dan diidentifikasi dari limbah industri penyamakan kulit (limbah padat dan cair) serta tanah disekitar industri. Sebanyak 2,5% dari jumlah isolat yang diisolasi telah diidentifikasi berpotensi sebagai bakteri proteolitik dengan potensi yang paling maksimal adalah isolat dari tanah (T) dan limbah padat (LP) pada pH 10 dan 12.

## DAFTAR PUSTAKA

- Akhdiyah, A. 2003. Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Protease Alkalin Termotabil. Buletin Plasma Nutfah, 9(2): 38-44.
- Baehaki, A., Rinto dan A. Budiman. 2011. Isolasi dan karakterisasi protease dari bakteri tanah rawa Indralaya, Sumatera Selatan. J. Teknol. dan Industri Pangan, 22(1): 37-42.
- Bower, J. 1992. Food Theory and Applications. 2nd New York, USA.
- Durham, D. R., D. B. Stewart, and E. J. Stellwag. 1987. Novel alkaline and heat stable serine proteases from alkaliphilic *Bacillus* sp. strain GX6638. J. Bacterial., 169(6): 2762- 2768.
- Fujiwara, N., and K. Yamamoto. 1987. Production of alkaline protease in low cost medium by alkaliphilic *Bacillus* sp. and properties of the enzyme. J. Ferment. Technol., 65(3): 345-348.

- Girindra, A. 1993. Biokimia I. PT Gramedia Pustaka, Jakarta. p. 91-113
- Lay, B.W. 1989. Analisis Mikrobial di Laboratorium. PT. Raja Grafindo Persada, Jakarta.
- Lehninger, A.L. 2008. Principles of Biochemistry. Fifth ed. David L. Nelson and M. M. Cox. W.H. Freeman and Company, NY.
- Malathi, S., dan R. Chakraborty. 1991. Production of Alkaline Protease by a new *Aspergillus flavus* isolat under solid substrat fermented condition for used as a depilation agent. *Applied and Enviromental Microbiology*, 57: 712-716.
- Moon, S.H. and S.J. Parulekar. 1993. Some observation on protease producing incontiguous suspension cultures of *Bacillus firmus*. *Biotech*. 41 ; 43-54.
- Nasahi, C., 2010. Peran Mikroba dalam Pertanian Organik. Materi Ajar. Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan. Fakultas Pertanian Universitas Padjadjaran, Bandung.
- Said, M. I. 2000. Isolasi dan Identifikasi Kapang pada Kulit Kambing serta Pengaruhnya Terhadap Sifat Fisik dan Struktur Jaringan Kulit Kambing Pickle serta Wet Blue dengan Perlakuan Fungisida selama Penyimpanan. Tesis. Program Studi Ilmu Peternakan, Sekolah Pascasarjana, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Sarkar, K. T. 1995. Theory and Practice of Leather Manufacture. The Author 4. Second Avenue, Mahatma Gandhi Road, Madras.
- Suhartono M. T, 2000. Eksplorasi protease bakteri asal Indonesia untuk aplikasi industri dan riset bioteknologi. Prosiding Seminar Nasional Industri Enzim dan Bioteknologi II. 125-133.
- Thangam, E. Berla, T. Nagarajan, G. Suseela Rajmukar, N. K. Chandrababu. 2001. Application of alkaline protease isolated from *Alkaligenes faecalis* for enzymatic unhairing in tanneries. *JALCA*. 96 : 127-132.
- Triatmojo, S. 2004. Penanganan Limbah Peternakan. Jurusan Teknologi Hasil Ternak. Fakultas Peternakan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Ward, O. P. 1983. Proteinases. In Fogarty, W.M. (Ed.). *Microbial Enzymes and Biotechnology*. Applied Science Publishers, London. p. 251-290.