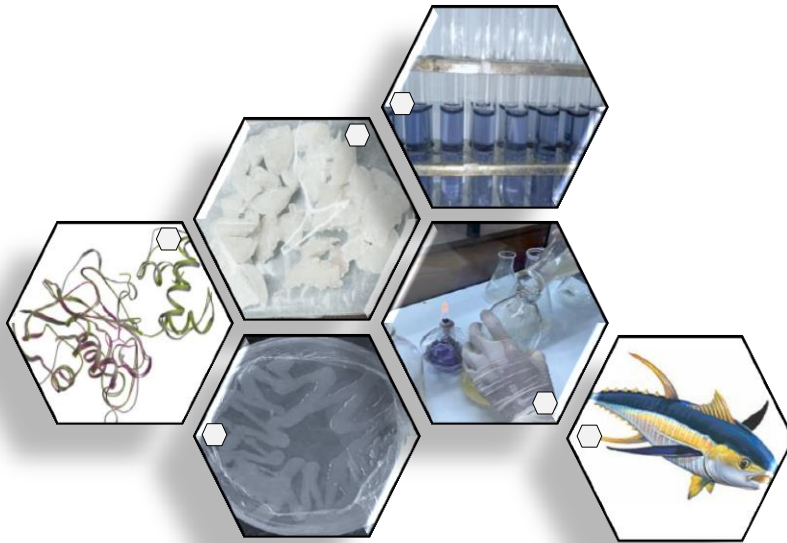


**PRODUKSI DAN KARAKTERISASI ENZIM KOLAGENASE  
DARI BAKTERI LAUT MENGGUNAKAN SUBSTRAT KOLAGEN  
KULIT IKAN TUNA SIRIP KUNING (*Thunnus albacares*)**



**INAYAH MUTHMAINNA NINGKEULA**

**H031201070**



**PROGRAM STUDI KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2024**

**PRODUKSI DAN KARAKTERISASI ENZIM KOLAGENASE  
DARI BAKTERI LAUT MENGGUNAKAN SUBSTRAT KOLAGEN  
KULIT IKAN TUNA SIRIP KUNING (*Thunnus albacares*)**

**INAYAH MUTHMAINNA NINGKEULA  
H031201070**



**PROGRAM STUDI KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2024**

**PRODUKSI DAN KARAKTERISASI ENZIM KOLAGENASE  
DARI BAKTERI LAUT MENGGUNAKAN SUBSTRAT KOLAGEN  
KULIT IKAN TUNA SIRIP KUNING (*Thunnus albacares*)**

INAYAH MUTHMAINNA NINGKEULA  
H031201070

Skripsi

Sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar sarjana

**PROGRAM STUDI KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2024**

**SKRIPSI**

**PRODUKSI DAN KARAKTERISASI ENZIM KOLAGENASE  
DARI BAKTERI LAUT MENGGUNAKAN SUBSTRAT KOLAGEN  
KULIT IKAN TUNA SIRIP KUNING (*Thunnus albacares*)**

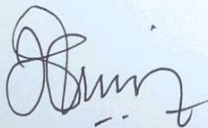
**INAYAH MUTHMAINNA NINGKEULA**  
**H031201070**

Skripsi,

Telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Sarjana Program Studi Kimia pada  
tanggal 13 Agustus 2024  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan  
pada

Program Studi Kimia  
Departemen Kimia  
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Universitas Hasanuddin  
Makassar

Mengesahkan:  
Pembimbing Tugas Akhir,



Prof. Dr. Hasnah Natsir, M.Si  
NIP. 196203201987112 001

Mengetahui:  
Ketua Program Studi,



Dr. St. Fauziah, M.Si  
NIP. 197202021999032002

## PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa, skripsi berjudul "Produksi dan Karakterisasi Enzim Kolagenase dari Bakteri Laut Menggunakan Substrat Kolagen Kulit Ikan Tuna Sirip Kuning (*Thunnus albacares*)" adalah benar karya saya dengan arahan dari pembimbing (Prof. Dr. Hasnah Natsir, M.Si). Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apapun kepada perguruan tinggi manapun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka skripsi ini. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan skripsi ini adalah karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut berdasarkan aturan yang berlaku.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta (hak ekonomis) dari karya tulis saya berupa skripsi ini kepada Universitas Hasanuddin.

Makassar, 13 Agustus 2024



Inayah Muthmainna Ningkeula  
H031201070

## UCAPAN TERIMA KASIH

Segala puji syukur penulis panjatkan atas kehadiran ALLAH SWT atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya. Sholawat serta salam kita kirimkan kepada Nabi Muhammad SAW yang selalu dinantikan syafa'atnya di akhirat nanti. Alhamdulillah, penulis dapat dapat menyelesaikan skripsi ini yang berjudul “**Produksi dan Karakterisasi Enzim Kolagenase dari Bakteri Laut Menggunakan Substrat Kolagen Kulit Ikan Tuna Sirip Kuning (*Thunnus albacares*)**”. Sebagai salah satu syarat mendapatkan gelas sarjana sains Departemen Kimia, FMIPA, Universitas Hasanuddin.

Ucapan terima kasih dan penghargaan sebesar-besarnya kepada dosen pembimbing Ibu **Prof. Dr. Hasnah Natsir, M.Si** yang telah membimbing dengan sabar, selalu memberikan arahan dan motivasi hingga penulis bisa berada pada tahap penyelesaian skripsi ini. Serta kepada Bapak **Dr. Fredryk Welliam Mandey, M.Sc** dan Ibu **Bulkis Musa, S.Si., M.Si** selaku dosen penguji yang telah memberikan banyak ilmu, saran, dan masukan yang bersifat membangun kepada penulis selama proses penyusunan skripsi ini. Ucapan terima kasih juga kepada:

1. Ketua Departemen Kimia Ibu **Dr. St. Fauziah, M.Si** dan Ibu dan Sekretaris Departemen Kimia Ibu **Dr. Nur Umriani Permatasari, M.Si.**, dan seluruh dosen, serta staf dan pegawai atas bimbingan dan bantuannya dalam proses perkuliahan maupun dalam penyelesaian tugas akhir ini.
2. Kepala laboratorium biokimia Ibu **Dr. Rugaiyah A. Arfah, M.Si** yang telah memberikan izin pemakaian laboratorium biokimia.
3. Seluruh analis laboratorium yang senantiasa membantu penulis dalam memenuhi kelengkapan bahan dan alat selama proses penelitian berlangsung di laboratorium.
4. Seluruh dosen di lingkungan Fakultas MIPA, terkhusus **Dosen Departemen Kimia**, yang telah memberikan banyak ilmu kepada penulis selama masa studi.
5. Seluruh staf pegawai Fakultas MIPA yang telah memberikan bantuan dan kerjasamanya.
6. Kedua orang tua, papa tercinta (Alm) **Muhsin Ningkeula** dan mama tersayang **Patma Litoloy** yang selalu memberikan doa yang tidak pernah putus, motivasi, kasing sayang, dan telah membantu baik secara moril, maupun materil dalam perjalanan penulis sampai titik ini.
7. Adik-adik, **Abdul Haq Prawira N, Muhammad Usman Digoel N, Dhafir Abqari Ramadhan N**, serta **Keluarga** yang selalu mendoakan dan memberikan dukungan kepada penulis.
8. Teman penelitian sekaligus sahabat terbaik penulis **Afifah Nur Falah Madani Pertiwi** yang selalu menemani, memberi dukungan, serta berjuang bersama mulai dari awal perkuliahan hingga proses penyelesaian skripsi ini.
9. Sahabat-sahabat penulis **Aisyah Wulandari, Husnia Paraditha Husain, Hafizhah Dhiya'ul Haq**, rekan kuliah **Kadek Susi Badrawati, Jummi**

**Palullungan**, yang telah kebersamai dan membantu penulis selama perkuliahan.

10. Sahabat-sahabat tersayang, **Nadiya Nahdah Kadir** dan **Muafifah Muhtar** telah menjadi saudara penulis selama diperantauan yang selalu menemani, membantu, memberi semangat dan menjadi tempat cerita penulis selama suka dan duka.
11. Teman dan kakak peneliti biokimia terkhusus **Leony Kathrin Pobuti**, Kak **Wahyudin Rauf**, Kak **Anita** yang senantiasa selalu ada, membagi ilmu, membantu, memberi saran dan masukkan dari awal penelitian hingga saat ini.
12. Teman-teman Senja(ta), **Ifah, Kadek, Dwi, Febi, Nanda, Usnur, Fira, Sukma, Fiza, Pila, Dea, Gav, Megi**, dan **Haini** yang telah senantiasa membantu, memberi dukungan, kebersamai di kampus dan menjadi teman healing.
13. Teman-teman **ISOMER, Demisioner Pengurus HMK 2022/2023** yang selama ini telah berjuang bersama-sama melewati masa studi dan proses di himpunan dari awal perkuliahan hingga saat ini.
14. Teman-teman KKN Boba, **Ica, Mj, Nisa, Mita, Ghazwul, Aim, Ince, Aldi**, dan **Hazyim** yang telah berbagi cerita baru selama kkn hingga saat ini.
15. Teman-teman **Speedy17, Bulamp20** yang senantiasa selalu kebersamai dan memberikan semangat kepada penulis sampai sekarang.
16. Diri saya sendiri **Inayah Muthmainna Ningkeula** atas kerja keras, semangat, tidak pernah menyerah dan telah berjuang dari awal kuliah sampai berada di titik sekarang.
17. Semua pihak yang tidak sempat ditulis namanya yang telah memberikan dukungan dan bantuan baik secara langsung atau tidak kepada penulis.

Akhir kata, penulis menyadari bahwa skripsi ini masih banyak kekurangan dan masih jauh dari kata sempurna. Penulis mengharapkan kritik dan saran yang sangat membangun agar dapat bermanfaat bagi penulis pribadi, pembaca, maupun bagi pengembangan ilmu pengetahuan.

Penulis,

Inayah Muthmainna Ningkeula

## ABSTRAK

INAYAH MUTHMAINNA NINGKEULA. **Produksi dan Karakterisasi Enzim Kolagenase dari Bakteri Laut Menggunakan Substrat Kolagen Kulit Ikan Tuna Sirip Kuning (*Thunnus albacares*)** (dibimbing oleh Hasnah Natsir).

**Latar Belakang.** Enzim kolagenase adalah enzim proteolitik yang spesifik menghidrolisa protein kolagen dan tidak dapat memecah protein jenis lain, sehingga kecil kemungkinan merusak jaringan. Enzim kolagenase memiliki banyak manfaat diantaranya pada bidang medis, eksperimen biologi molekuler dan industri makanan. **Tujuan.** Penelitian ini bertujuan untuk menentukan waktu optimum produksi, menguji aktivitas dan karakterisasi enzim kolagenase dari bakteri laut menggunakan substrat kolagen kulit ikan tuna sirip kuning (*Thunnus albacares*). **Metode.** Penelitian terdiri dari beberapa tahapan, diantaranya: 1) ekstraksi kolagen dari kulit ikan tuna sirip kuning; (2) uji kolagenolitik bakteri laut; (3) produksi dan uji aktivitas enzim kolagenase dari bakteri laut; (4) karakterisasi enzim kolagenase. **Hasil.** Bakteri laut memiliki aktivitas kolagenolitik yang besar. Enzim kolagenase memiliki aktivitas kolagenase dan dipengaruhi oleh pH, suhu, konsentrasi substrat dan ion logam **Kesimpulan.** Bakteri laut isolat memiliki aktivitas kolagenase dan enzim kolagenase dapat menghidrolisis.

**Kata kunci:** Bakteri laut; Kolagen; Kolagenase; Substrat; *Thunnus albacares*



## ABSTRACT

INAYAH MUTHMAINNA NINGKEULA. **Production and Characterization of Collagenase Enzyme from Marine Bacteria Using Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*) Skin Collagen Substrate** (supervised by Hasnah Natsir).

**Background.** The collagenase enzyme is a proteolytic enzyme which specifically hydrolyzes collagen protein and cannot break down other types of protein, so it is unlikely to cause damage tissue. The collagenase enzyme has many uses, including in the medical field, molecular biology experiments and the food industry. **Aims.** This research aims to determine the optimum production time, test the activity and characterization of collagenase enzymes from marine bacteria using yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) skin collagen as a substrate. **Methods.** The research consists of several stages, including: 1) collagen extraction from yellowfin tuna skin; (2) collagenolytic test of marine bacteria; (3) production and testing of collagenase enzyme activity from marine bacteria; (4) characterization of the collagenase enzyme. **Results.** The marine bacterium has great collagenolytic activity. The collagenase enzyme has collagenase activity and is influenced by pH, temperature, substrate concentration and metal ions. **Conclusion.** The marine bacteria isolate has collagenase activity and the collagenase enzyme can hydrolyze.

**Keywords:** Collagen; Collagenase; Marine bacteria; Substrate; *Thunnus albacares*

## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
ABSTRAK .....	vii
ABSTRACT .....	viii
DAFTAR ISI .....	ix
DAFTAR TABEL .....	xi
DAFTAR GAMBAR .....	xii
DAFTAR LAMPIRAN .....	xiii
DAFTAR SIMBOL DAN SINGKATAN.....	xiv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	3
1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian.....	3
1.3.1 Maksud Penelitian .....	3
1.3.2 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Manfaat Penelitian .....	3
BAB II METODE PENELITIAN .....	4
2.1 Bahan Penelitian .....	4
2.2 Alat Penelitian .....	4
2.3 Waktu dan Tempat Penelitian.....	4
2.4 Prosedur Penelitian.....	4
2.4.1 Ekstraksi Kolagen Kulit Ikan Tuna Sirip Kuning .....	4
2.4.2 Pembuatan Media .....	5
2.4.3 Peremajaan Bakteri Laut.....	6
2.4.4 Uji Kolagenolitik Bakteri Laut.....	6
2.4.5 Persiapan Inokulum.....	6
2.4.6 Penentuan Waktu Produksi Optimum Enzim Kolagenase .....	6
2.4.7 Penentuan Aktivitas Enzim Kolagenase.....	7
2.4.8 Penentuan Kadar Protein Enzim Kolagenase .....	7
2.4.9 Produksi Enzim Kolagenase.....	7
2.4.10 Karakterisasi Enzim Kolagenase.....	8
2.4.11 Hidrolisis Kolagen Kulit Ikan Tuna Sirip Kuning .....	8
BAB III HASIL DAN PEMBAHASAN.....	9

3.1 Ekstraksi Kolagen Kulit Ikan Tuna Sirip Kuning.....	9
3.2 Uji Kolagenolitik Bakteri Laut .....	11
3.3 Penentuan Waktu Produksi Optimum Enzim Kolagenase.....	12
3.4 Karakterisasi Enzim Kolagenase .....	13
3.5 Hidrolisis Kolagen Kulit Ikan Tuna Sirip Kuning.....	14
BAB IV KESIMPULAN DAN SARAN .....	16
4.1 Kesimpulan .....	16
4.2 Saran.....	16
DAFTAR PUSTAKA.....	17
LAMPIRAN.....	22

**DAFTAR TABEL**

<b>Nomor</b>	<b>Halaman</b>
1. Komposisi media produksi sebanyak 100 mL.....	6

**DAFTAR GAMBAR**

<b>Nomor</b>	<b>Halaman</b>
1. Reaksi NaOH dengan protein.....	9
2. Kolagen kulit ikan tuna sirip kuning .....	10
3. (a) Spektrum IR kolagen komersial dan (b) kolagen kulit ikan tuna sirip kuning .....	11
4. Bakteri laut isolat Sed 1.a dan Sed 2.c .....	12
5. Hidrolisis kolagen kulit ikan tuna sirip kuning oleh enzim kolagenase ...	15
6. Hidrolisis kolagen oleh kolagenase .....	15

**DAFTAR LAMPIRAN**

<b>Nomor</b>	<b>Halaman</b>
1. Diagram Alir Penelitian .....	22
2. Prosedur Penelitian .....	23
3. Peta Lokasi Pengambilan Sampel .....	34
4. Perhitungan Pembuatan Larutan .....	35
5. Dokumentasi Penelitian .....	38

**DAFTAR SIMBOL DAN SINGKATAN**

<b>Simbol/singkatan</b>	<b>Arti dan Penjelasan</b>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CBD	<i>Collagen-binding Domain</i>
ECM	<i>Extracellular matrix</i>
FTIR	<i>Fourier Transform Infra Red</i>
mM	Milimolar
OD	<i>Optical Density</i>
pH	<i>Potential of Hydrogen</i>
PKD	<i>Polycystic Kidney Diseases</i>
Rpm	<i>Rotation per minute</i>
TCA	<i>Trichloroacetic Acid</i>
U/mL	Unit per mili
$\mu$ L	Mikroliter
$\alpha$	Alpha
$\beta$	Beta
$\lambda$	Panjang gelombang

# BAB I PENDAHULUAN

## 1.1 Latar Belakang

Enzim merupakan kelompok protein yang memegang peranan penting dalam aktivitas biologis. Enzim berfungsi sebagai katalisator yang mengatur reaksi tertentu sehingga hasil reaksi tetap dalam keadaan normal tanpa penyimpangan (Sembiring et al., 2021). Berbagai penelitian mengenai pemanfaatan enzim telah banyak dilakukan, salah satunya adalah enzim protease (Fathimah dan Wardani, 2014). Enzim protease dapat menghidrolisis ikatan peptida dan protein menjadi oligopeptida dan asam amino (Sumardi et al., 2021). Enzim protease yang berasal dari mikroorganisme lebih menguntungkan dibandingkan enzim protease yang diisolasi dari tanaman maupun hewan. Salah satu jenis enzim protease yang berasal dari mikroorganisme adalah enzim kolagenase (Chaucan and Prabha, 2017).

Enzim kolagenase merupakan enzim yang menghidrolisis kolagen yang tidak larut dalam air. Enzim kolagenase memiliki banyak manfaat diantaranya pada bidang medis, eksperimen biologi molekuler dan industri makanan. Pemanfaatan enzim kolagenase dalam bidang medis yaitu perbaikan radang pada jaringan, transplantasi klinis, serta mempercepat penyembuhan luka (Febrina et al., 2022). Kolagenase telah diisolasi dan dikarakterisasi dari sel bakteri dan jaringan hewan. Kolagenase bakteri telah berhasil ditemukan dari berbagai sumber seperti tanah, air, dan kaviar. Beberapa bakteri penghasil kolagenase adalah *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, dan *Streptomyces sp.* (Wu et al., 2010).

Aktivitas enzim untuk dapat menghidrolisis khususnya protein dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti konsentrasi protein, pH, suhu, substrat, inhibitor dan aktivator. Hal ini terjadi karena struktur tiga dimensi enzim mulai berubah, sehingga substrat tidak dapat berikatan dengan sisi aktif enzim akibatnya proses katalis tidak dapat berlangsung secara sempurna (Nurkhotimah et al., 2017). Enzim kolagenase diperoleh dari hasil fermentasi bakteri dengan menggunakan substrat tertentu. Substrat yang digunakan dalam pembentukan enzim kolagenase adalah substrat yang mengandung kolagen (Febrina et al., 2022).

Kolagen adalah protein yang paling melimpah dalam jaringan hewan dengan proporsi 30% dari total protein tubuh sebagai komponen utama dari jaringan ikat, otot, gusi dan kulit (Ata et al., 2017). Kolagen dari ikan menjadi sumber yang baik karena ketersediaannya yang tinggi dan risiko penularan penyakit yang lebih rendah dibandingkan dengan sumber kolagen lain seperti kulit dan tulang sapi atau babi. Ikan memiliki kandungan protein lebih dari 90% dan 18 jenis asam amino yang 7 diantaranya penting untuk konsumsi manusia. Industri ikan tuna di Indonesia merupakan industri perikanan yang semakin berkembang. Kementerian Kelautan dan Perikanan (2021) mencatat, Indonesia memproduksi ikan tuna pada tahun 2021 naik 19,22% dibandingkan pada tahun sebelumnya. Berdasarkan wilayahnya, produksi ikan tuna terbesar berada di Sulawesi Selatan sebanyak



56.205,3 ton pada tahun 2021. Jumlah produksi ikan tuna yang besar dapat menyebabkan peningkatan jumlah limbah salah satunya yaitu kulit ikan tuna (Wirayudha et al., 2022).

Ikan tuna yang digunakan hanya 40-60% dari bagiannya, sedangkan sisanya menjadi limbah. Limbah yang dihasilkan adalah isi perut, kepala, sirip, kulit, duri dan tulang. Limbah berupa tulang dan kulit ikan merupakan limbah terbesar yang jumlahnya sekitar 20% dari total berat badan. Limbah kulit dan tulang ikan tuna ini belum dimanfaatkan secara optimal. Salah satu alternatif untuk optimalisasi pemanfaatan limbah kulit ikan tuna adalah pembuatan kolagen (Sembiring et al., 2020). Sumber kolagen dapat berasal dari kulit yang merupakan limbah dari hasil pengolahan (Kittiphattanabawon et al., 2010). Menurut Mayasari (2016), bahwa kulit ikan tuna (*Thunnus albacares*) termasuk kulit yang memiliki protein tinggi sehingga berpotensi untuk dijadikan sumber kolagen.

Penelitian mengenai kolagen dari kulit ikan telah banyak dilakukan antara lain kulit tuna albakora (*Thunnus alalunga*) dengan rendamen 13,97% (Hema et al., 2013), ikan tuna sirip kuning (*Thunnus albacares*) rendamen 26,7% (Woo et al., 2008), ikan tuna mata besar (*Thunnus obesus*) rendamen 3,05% (Devita et al., 2021), kulit ikan ekor kuning dengan rendamen 18,4% (Astiana et al., 2016), dan ikan cakalang dengan rendamen 16,71% (Ata et al., 2016). Faktor yang dapat menyebabkan perbedaan hasil rendemen adalah kondisi saat *pretreatment* dan ekstraksi yang berbeda. Proses ekstraksi yang berbeda kemungkinan dapat menghasilkan karakteristik kolagen yang berbeda sesuai dengan kelarutannya (Kolanus et al., 2019).

Kulit ikan memiliki protein struktural yang kompleks untuk mempertahankan kekuatan fleksibilitas kulit, ligamen, tulang, sendi, otot, tendon, gusi, mata, pembuluh darah, kuku, dan rambut (Kolanus et al., 2019). Kulit dan sisik memiliki kandungan kolagen yang lebih tinggi dibandingkan pada bagian tulang (Nurilmala et al., 2017). Kulit ikan merupakan bahan baku yang baik untuk mengisolasi kolagen karena kolagen merupakan penyusun 80% protein yang terdapat pada kulit ikan (Devi et al., 2017).

Penelitian terkait produksi enzim kolagenase dari bakteri menggunakan substrat kolagen telah dilakukan oleh Baehaki et al. (2012) yaitu produksi enzim kolagenase dari *Bacillus licheniformis* F11.4 menggunakan substrat kolagen kulit ikan. Suhu dan pH optimum masing-masing adalah 50 °C dan pH 7,0. Aktivitas kolagenase dihambat oleh ion logam konsentrasi 1 mM yaitu Fe<sup>2+</sup> (40,75%), Mg<sup>2+</sup> (13,54%), Mn<sup>2+</sup> (48,80%), Co<sup>2+</sup> (6,31%). Aktivitas kolagenase diaktifkan Ca<sup>2+</sup> (108,36%) dan Cu<sup>2+</sup> (131,56%). Selain itu, penelitian lain Febrina et al. (2022) yaitu produksi enzim kolagenase dari *Bacillus sp.* KUB BPPT CC menggunakan substrat kolagen kulit ceker ayam. Aktivitas enzim kolagenase tertinggi pada jam ke-36 sebesar 1,001 U/mL, optimum pada suhu 50 °C dan pH 10. Penelitian ini dilakukan untuk memproduksi dan karakterisasi enzim kolagenase dari bakteri laut menggunakan substrat kolagen kulit ikan tuna sirip kuning (*Thunnus albacares*).

## **1.2 Rumusan Masalah**

Rumusan masalah dari penelitian ini adalah:

1. Bagaimana kondisi optimum produksi enzim kolagenase dari bakteri laut menggunakan substrat kolagen kulit ikan tuna sirip kuning?
2. bagaimana aktivitas enzim kolagenase dari bakteri laut?
3. bagaimana karakteristik enzim kolagenase dari bakteri laut?

## **1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian**

### **1.3.1 Maksud Penelitian**

Maksud dari penelitian ini adalah untuk memproduksi dan karakterisasi enzim kolagenase dari bakteri laut menggunakan substrat kolagen kulit ikan tuna sirip kuning.

### **1.3.2 Tujuan Penelitian**

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. menentukan kondisi optimum produksi enzim kolagenase dari bakteri laut menggunakan substrat kolagen kulit ikan tuna sirip kuning
2. menentukan aktivitas enzim kolagenase dari bakteri laut
3. menentukan karakteristik enzim kolagenase dari bakteri laut

## **1.4 Manfaat Penelitian**

Manfaat dari penelitian ini adalah:

1. memproduksi enzim kolagenase dari bakteri laut
2. sebagai upaya untuk memanfaatkan limbah kulit ikan tuna sirip kuning menjadi kolagen

## **BAB II METODE PENELITIAN**

### **2.1 Bahan Penelitian**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit ikan tuna sirip kuning, bakteri laut isolat Sed 1.a, isolat Sed 2.c, *nutrient agar*, *agar base*, *yeast*, *yeast extract*, pepton, *bacto pepton*,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Merck),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Merck), NaOH (Merck),  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (Merck), NaCl (Merck), KBr (Merck), KCl (Merck),  $\text{CaCl}_2$  (Merck),  $\text{MgCl}_2$  (Merck),  $\text{HgCl}_2$  (Merck), BSA, Na-K-Tatrat,  $\text{CuSO}_4$  (Merck),  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (Merck), TCA, tirosin, buffer fosfat, buffer sitrat, *folin-ciocalteu* (Merck), *paper disc* air laut steril, akuades dan akuabides.

### **2.2 Alat Penelitian**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu botol vial, jarum ose, lampu spiritus, pH meter, mikropipet (100-1000  $\mu\text{L}$ ), kain katun tipis, *hotplate*, *vortex*, *shaker waterbath* (WBS-18), *freeze dryer*, *autoclave* (Model 8000 DSE Napco), *centrifuge* (Hermle Z 366 K), neraca analitik (Ohaus), inkubator (Mettler), FTIR (Shimadzu), spektrofotometri UV-Vis, dan peralatan gelas yang umum digunakan di laboratorium.

### **2.3 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari 2024-Juni 2024 di Laboratorium Kimia Biokimia, Laboratorium Kimia Terpadu Departemen Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Laboratorium Terpadu Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin, dan Laboratorium Analisis Pangan, Jurusan Teknik Kimia, Politeknik Negeri Ujung Pandang. Pengambilan sampel dilakukan di PT. Chen Woo Fishery, Jl. Kima IV, Tamalanrea, Kota Makassar.

### **2.4 Prosedur Penelitian**

#### **2.4.1 Ekstraksi Kolagen Kulit Ikan Tuna Sirip Kuning**

##### **a. Preparasi Sampel (Kolanus et al., 2019)**

Kulit ikan tuna sirip kuning sebanyak 150 g dibersihkan dari daging dan sisik yang masih menempel, kemudian dicuci dengan air bersih. Selanjutnya, sampel dipotong menjadi ukuran kecil sekitar 2-3 cm. Setelah itu, dicuci kembali dan ditiriskan untuk menghilangkan air sisa pencucian.

##### **b. Ekstraksi Kolagen (Ata et al., 2016; Kolanus et al., 2019)**

Ekstraksi kolagen tahap pertama yaitu *pretreatment* dengan larutan NaOH. Kulit ikan sebanyak 100 g direndam dalam larutan NaOH 0,05 M selama 6 jam dengan rasio antara kulit dan larutan NaOH adalah 1:10 (b/v). Larutan NaOH diganti sebanyak 3 (tiga) kali pada selang waktu 2 (dua) jam. Selanjutnya kulit ikan hasil perendaman dinetralkan dengan akuades hingga pH netral. Tahap selanjutnya

yaitu ekstraksi dengan larutan  $\text{CH}_3\text{COOH}$ . Sampel direndam dalam  $\text{CH}_3\text{COOH}$  0,5 M (1:10) (b/v) selama 3 hari. Hasil ekstrak yang diperoleh kemudian disaring menggunakan kain katun tipis untuk mendapatkan filtrat. Filtrat yang diperoleh dipresipitasi secara *salting out* menggunakan  $\text{NaCl}$  2,6 M selama 24 jam. Hasil *salting out* disentrifugasi pada kecepatan 6.000 rpm selama 30 menit. Selanjutnya hasil sentrifugasi dikering-bekukan dengan *freeze dryer* selama 24 jam untuk diperoleh kolagen kering. Kolagen yang dihasilkan, kemudian ditimbang untuk mengetahui jumlah rendemen. Jumlah rendemen dapat dihitung dengan rumus:

$$\text{Rendamen kolagen (\%)} = \frac{\text{Berat kolagen (g)}}{\text{Berat bahan baku (g)}} \times 100\% \quad (1)$$

### c. Karakterisasi Kolagen (Muyonga et al., 2004; Nurjanah et al., 2021)

Karakterisasi kolagen yang dilakukan adalah uji gugus fungsi menggunakan FTIR. Analisis gugus fungsi khas pada kolagen dilakukan menggunakan prinsip FTIR. Kolagen sebanyak 2 mg ditumbuk halus dengan KBr 100 mg. Campuran kolagen dicetak dalam cetakan pelet. Pelet yang dihasilkan kemudian dikeluarkan dari cetakan dan diletakkan pada *tablet holde* untuk dilakukan pengukuran dengan alat FTIR. Sinar inframerah ditembakkan dari spektrofotometer inframerah  $\text{IR-400 cm}^{-1}$  sampai  $4.000 \text{ cm}^{-1}$  pada kolagen yang telah berbentuk pelet. Pendeteksian gugus fungsi dapat dihasilkan pada monitor yang akan menampilkan puncak-puncak serapan bilangan gelombang.

## 2.4.2 Pembuatan Media

### a. Media Peremajaan (Doringin et al., 2020)

*Nutrient agar* sebanyak 2,8 g dilarutkan dengan 100 mL air laut steril dalam Erlenmeyer 250 mL. Selanjutnya media disterilkan menggunakan *autoclave* pada suhu  $121^\circ\text{C}$  selama 15 menit. Kemudian media dalam keadaan hangat dituang ke dalam cawan petri steril, dan diamkan sampai media mengeras.

### b. Media Substrat Kolagen (Zebua et al., 2020)

Substrat kolagen 1%, *agar base* sebanyak 2 g, *yeast* sebanyak 0,5 g, pepton sebanyak 0,5 g, dan  $\text{NaCl}$  sebanyak 0,5 g dilarutkan dengan air laut steril hingga volume 100 mL dalam Erlenmeyer 250 mL. Selanjutnya media disterilkan menggunakan *autoclave* pada suhu  $121^\circ\text{C}$  selama 15 menit. Kemudian dalam keadaan hangat dituang ke dalam cawan petri steril, dan diamkan sampai media mengeras. Prosedur yang sama dilakukan untuk pembuatan media substrat 2% dan 3%.

### c. Media Inokulum (Sartika et al., 2019)

*Bacto* pepton sebanyak 0,1 g, *yeast extract* sebanyak 0,5 g, dan  $\text{NaCl}$  sebanyak 0,1 g dilarutkan dengan 100 mL air laut steril dalam Erlenmeyer 250 mL. Selanjutnya media disterilkan menggunakan *autoclave* pada suhu  $121^\circ\text{C}$  selama 15 menit. Kemudian media didiamkan hingga dingin.

#### d. Media Produksi (Rutu et al, 2015)

Media produksi dibuat sebanyak 100 mL dengan komposisi yang dapat dilihat pada Tabel 1. dalam Erlenmeyer 250 mL. Selanjutnya media disterilkan menggunakan *autoclave* pada suhu 121 °C selama 15 menit. Kemudian media didiamkan hingga dingin.

**Tabel 1.** Komposisi media produksi sebanyak 100 mL

No.	Komposisi	Jumlah
1.	<i>yeast extract</i>	0,5 g
2.	<i>bacto pepton</i>	0,1 g
3.	NaCl	0,5 g
4.	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,7 g
5.	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1 g
6.	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,01 g
7.	CaCl <sub>2</sub>	0,05 g
8.	Substrat kolagen	1 mL
9.	Air laut steril	99 mL

#### 2.4.3 Peremajaan Bakteri Laut (Setyati et al., 2015)

Isolat Sed 1.a diremajakan pada media peremajaan. Koloni diambil sebanyak satu ose kemudian digores dengan metode kuadran pada media peremajaan dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Prosedur yang sama dilakukan untuk isolate Sed 2.c.

#### 2.4.4 Uji Kolagenolitik Bakteri Laut (Rochima et al., 2016; Shirzad et al., 2018)

Isolat Sed 1.a yang telah diremajakan diambil sebanyak satu ose kemudian digoreskan pada media substrat dengan 3 konsentrasi berbeda, selanjutnya diinkubasi pada suhu 37 °C selama 3x24 jam. Aktivitas kolagenolitik diamati setiap 1x24 jam. Adanya zona bening menunjukkan isolat tersebut menghasilkan kolagenase. Aktivitas kolagenolitik ditentukan dengan rumus:

$$\text{Indeks kolagenolitik} = \frac{\text{Diameter zona bening (mm)}}{\text{Diameter koloni bakteri (mm)}} \quad (2)$$

#### 2.4.5 Persiapan Inokulum (Zhu et al., 2022)

Isolat Sed 1.a diinokulasi ke dalam labu Erlenmeyer 250 mL yang berisi 100 mL media Inokulum dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam dengan pengocokan pada kecepatan 150 rpm.

#### 2.4.6 Penentuan Waktu Optimum Produksi Enzim Kolagenase (Sartika et al., 2019)

Kultur (10% inokulum) dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 500 mL yang berisi 150 mL media produksi (komposisi pada Tabel 1.) dan diinkubasi pada 37 °C selama 96

jam dengan pengocokan 150 rpm. Penentuan waktu optimum produksi kolagenase dilakukan dengan pengambilan sampel dilakukan setiap 12 jam selama 96 jam. *Optical density* (OD) ditentukan dengan mengukur serapan pada  $\lambda = 670$  nm. Selanjutnya, disentrifugasi pada kecepatan 3.500 rpm dan suhu 4 °C selama 30 menit, supernatan dikumpulkan sebagai ekstrak kasar enzim kolagenase. Kemudian dilakukan uji aktivitas dan kadar protein enzim kolagenase.

#### 2.4.7 Penentuan Aktivitas Enzim Kolagenase (Baehaki et al., 2012; Sartika et al., 2019)

Penentuan aktivitas kolagenase dilakukan berdasarkan metode Bergmeyer (1983) dengan cara mereaksikan 1 mL buffer fosfat 0,2 M (pH 7,0), 0,2 mL larutan enzim, dan 1 mL substrat kolagen 2% ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya, diinkubasi pada suhu 37 °C selama 10 menit. Kemudian ditambahkan TCA 0,1 M sebanyak 2 mL dan akuades sebanyak 0,2 mL, lalu diinkubasi pada suhu 37 °C selama 10 menit dan dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Supernatan hasil sentrifugasi dipipet sebanyak 1,5 mL, ditambahkan Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,4 M sebanyak 5 mL, dan *folin-ciocalteu* (2:1) sebanyak 1 mL. Kemudian, didiamkan selama 20 menit pada suhu 37 °C. Aktivitas enzim kolagenase diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan  $\lambda$  maks (700 nm), larutan tirosin digunakan sebagai standar enzim kolagenase. Aktivitas enzim kolagenase dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$UA = \frac{Asp - Abl}{Ast - Abl} \times fp \times \frac{1}{t} \quad (3)$$

Keterangan:

UA = satu unit aktivitas kolagenase yang menyebabkan perubahan 1  $\mu$ mol kolagen/menit

Asp = Nilai absorbansi sampel

Abl = Nilai absorbansi blanko

Ast = Nilai absorbansi standar

fp = Faktor pengenceran

t = Waktu inkubasi (menit)

#### 2.4.8 Penentuan Kadar Protein Enzim Kolagenase (Rutu et al., 2015)

Enzim kolagenase diukur kadar protein dengan metode Lowry, menggunakan *bovine serum albumin* (BSA) sebagai standar. Enzim kolagenase sebanyak 2 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan Lowry B sebanyak 2,75 mL, dan diinkubasi pada suhu 25 °C selama 15 menit. Kemudian, ditambahkan Lowry A sebanyak 0,25 mL dan diinkubasi pada suhu 25 °C selama 30 menit dengan sesekali dikocok. Serapannya diukur pada  $\lambda$  maks (670 nm) yang telah ditentukan dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis.

#### 2.4.9 Produksi Enzim Kolagenase (Rutu et al., 2015)

Enzim kolagenase diproduksi dalam volume besar sekitar 100 mL pada waktu optimum. Kultur (10% inokulum) dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 mL yang

berisi 100 mL media produksi (komposisi pada Tabel 1.) dan diinkubasi pada 37 °C selama waktu optimum dengan pengocokan 150 rpm. Kemudian disentrifugasi pada kecepatan 3.500 rpm, 4 °C selama 30 menit. Supernatan diukur volumenya sebagai hasil produksi ekstrak kasar enzim kolagenase. Selanjutnya dilakukan karakterisasi enzim kolagenase.

#### **3.4.10 Karakterisasi Enzim Kolagenase**

##### **a. Pengaruh pH Terhadap Aktivitas Enzim Kolagenase (Wu et al., 2010)**

Pengaruh pH pada aktivitas enzim, menggunakan buffer sitrat 0,2 M (pH 4,0; 5,0; dan 6,0) dan buffer fosfat 0,2 M (pH 7,0; dan 8,0) kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C. Kemudian diukur aktivitasnya menggunakan metode Bergmeyer (1983) sebanyak tiga kali ulangan (triplo).

##### **b. Pengaruh Suhu Terhadap Aktivitas Enzim Kolagenase (Wu et al., 2010)**

Pengaruh suhu untuk aktivitas ditentukan pada variasi suhu 35, 40, 45, 50, dan 55 °C, pH dijaga pada pH optimum. Kemudian diukur aktivitasnya menggunakan metode Bergmeyer (1983) sebanyak tiga kali ulangan (triplo).

##### **c. Pengaruh Konsentrasi Substrat Terhadap Aktivitas Enzim Kolagenase (Abood et al., 2018)**

Pengaruh konsentrasi substrat pada aktivitas enzim menggunakan variasi konsentrasi substrat 1%, 1,5% 2%, 2,5% dan 3%, menggunakan pH dan suhu optimum. Kemudian diukur aktivitasnya menggunakan metode Bergmeyer (1983) sebanyak tiga kali ulangan (triplo).

##### **d. Pengaruh Ion Logam Terhadap Aktivitas Enzim Kolagenase (Abood et al., 2018)**

Pengaruh ion logam terhadap aktivitas kolagenase ditentukan dengan cara penambahan monovalen ( $K^+$  dan  $Na^+$ ), divalen ( $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ , dan  $Hg^{2+}$ ). Reaksi dilakukan dengan pra-inkubasi kolagenase dengan ion logam pada konsentrasi akhir 5 dan 10 mM selama pada pH, suhu, dan konsentrasi substrat optimum. Kemudian diukur aktivitasnya menggunakan metode Bergmeyer (1983) sebanyak tiga kali ulangan (triplo) dan dibandingkan dengan enzim tanpa penambahan logam.

#### **2.4.11 Hidrolisis Kolagen Kulit Ikan Tuna Sirip Kuning (Rori et al., 2020)**

Enzim yang telah diproduksi diambil sebanyak 10  $\mu$ L dan 20  $\mu$ L, kemudian diteteskan diatas *paper disc*, dan didiamkan selama 30 menit. Kemudian *paper disc* diletakkan di atas media substrat kolagen yang telah dibuat, selanjutnya diinkubasi pada suhu 37 °C selama 2x24 jam. Adanya zona bening menunjukkan aktivitas enzim kolagenase. Larutan BSA digunakan sebagai kontrol negatif enzim.