

**PRODUKSI DAN KARAKTERISASI ENZIM KOLAGENASE
DARI BAKTERI LAUT MENGGUNAKAN SUBSTRAT KOLAGEN
KULIT IKAN NILA (*Oreochromis niloticus*)**



**AFIFAH NUR FALAH MADANI PERTIWI
H031201050**



**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 IKAN NILA (*Oreochromis niloticus*)**

**AFIFAH NUR FALAH MADANI PERTIWI
H031201050**



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

UCAPAN TERIMAKASIH

Bismillahirrahmanirrahim, segala puji dan syukur Penulis panjatkan kehadiran Allah SWT karena berkat rahmat dan karunia-Nya sehingga Penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul “**Produksi dan Karakterisasi Enzim Kolagenase dari Bakteri Laut Menggunakan Substrat Kolagen Kulit Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*)**”.

Shalawat serta salam semoga tetap tercurah kepada junjungan Nabi Muhammad SAW, manusia terbaik sepanjang masa, yang telah menjadi guru terbaik dan menjadi suri tauladan bagi umat Islam di seluruh dunia.

Ucapan terima kasih dan penghargaan Penulis sampaikan kepada seluruh pihak yang membantu dalam proses penyelesaian skripsi ini, terutama kepada ibunda **Prof. Dr. Hasnah Natsir, M.Si** selaku pembimbing yang menjadi orang tua Penulis di kampus dan senantiasa meluangkan waktu, tenaga, dan pikirannya dalam membimbing dan memberikan masukan yang baik terutama dalam penyelesaian skripsi ini. Tak lupa pula Penulis menghaturkan permohonan maaf yang sebesar-besarnya atas semua kesalahan yang tidak disengaja yang pernah dilakukan Penulis hingga penulisan skripsi ini diselesaikan.

Kepada kedua orang tua tercinta yang paling berjasa dalam hidup Penulis, ayahanda **Muhammad Amin** dan ibunda tercinta **Suryani Rusli** terima kasih untuk setiap semangat, motivasi, bantuan, kasih sayang, dan doa yang senantiasa tak henti-hentinya diberikan kepada Penulis, semoga Allah senantiasa memberikan rahmat berupa kasih sayang, keteguhan hati di atas agama Allah SWT. Terima kasih juga kepada saudara-saudara kandung Penulis **Kak Isty, Kak Ica, Agung, Akbar,** dan **Ayya** yang selalu memberikan motivasi, bantuan maupun semangat kepada Penulis selama mengerjakan tugas akhir ini.

Penulis juga tak lupa mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang sebesar-besarnya kepada:

1. Bapak **Drs. Fredryk Welliam Mandey, M.Sc** dan Ibu **Bulkis Musa, S.Si., M.Si** selaku tim penguji yang telah memberikan saran, kritik, dan masukan yang bersifat membangun terhadap penulisan ini.
2. Bapak **Muhammad Al Mustawa, S.Si., M.Si** selaku koordinator seminar yang telah memberi banyak masukan dan saran dalam penyelesaian skripsi ini.
3. Ibu **Dr. St. Fauziah, M.Si** dan ibu **Dr. Nur Umriani Permatasari, M.Si** selaku ketua dan sekretaris departemen kimia yang telah memberikan banyak kemudahan dan bantuan kepada penulis dalam menjalani studi dan dalam penyusunan skripsi ini.
4. Seluruh dosen Departemen Kimia, Staf FMIPA UNHAS, Staf Departemen Kimia, serta Staf Perpustakaan FMIPA UNHAS atas semua ilmu yang telah diajarkan dan pelayanan yang telah diberikan, serta bantuannya kepada penulis.
5. Seluruh Analis laboratorium di Departemen Kimia FMIPA Unhas, terkhusus Analis pada Laboratorium Biokimia Kak **Nure** dan Kak **Feni** beserta kakak peneliti terkhusus Kak **Anita** dan Kak **Yura** terima kasih atas bantuan semangat serta arahnya selama penelitian berlangsung.

6. Rekan penelitian **Nayah**, terima kasih telah berjuang bersama mengeluh bersama dan menyelesaikan tugas akhir ini bersama-sama hingga selesai.
7. Sahabat terkasih **SENJA(TA) (Dea, Dwi, Febby, Fira, Fiza, Gav, Haini, Kadek, Megi, Nanda, Nayah, Pila, Sukma dan Usnur)** dan **AURYGA (Aisyah dan Dita)**, terima kasih atas dukungan, bantuan, dan kebersamaannya selama duduk di bangku perkuliahan sehingga membuat penulis lebih semangat dalam menyelesaikan penelitian ini.
8. Teman-teman terbaik **GOLD KING (Ayu, Eva, Firda dan Lika), WALI PAPAT (Michael, Osama dan Rengga), Cindy** dan **Lela** terima kasih atas segala saran dan masukan serta memberikan semangat kepada penulis dalam menjalankan perkuliahan ini.
9. Teman-teman biokimia terkhusus **Leony, Sarah dan Alfi** terima kasih atas dukungan, hiburan, dan bantuannya selama menjalani penelitian.
10. Teman-teman seperjuangan di Departemen Kimia, terkhusus **ISOMER 2020**, terima kasih atas arahan dan masukan-masukannya selama kuliah.
11. Teman-teman pengurus **BEM KM FMIPA UNHAS 2023/2024** terkhusus **Imel, Dea, Gav, Iskar, Ahul, dan Firman** yang telah memberikan banyak kesan dan pengalaman dalam berorganisasi.
12. Teman-teman pengurus **HMK FMIPA UNHAS 2022/2023** terima kasih untuk kebersamaan dan pengalaman yang sangat berkesan yang diperoleh penulis dari awal bergabung di KMK FMIPA Unhas.
13. Sahabat sekaligus keluarga **KKN Reguler UNHAS Gelombang 110 Smart Village Barru 2 Kelurahan Kiru-Kiru**, terima kasih atas kebersamaan dan pengalaman berharga selama di lokasi KKN.
- 14.
15. Serta kepada seluruh pihak, tidak dapat penulis sebutkan satu persatu yang ikut serta membantu, sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik, terima kasih.

Penulis menyadari masih banyak kekurangan dan kesalahan dalam penyusunan skripsi ini, oleh karena itu saran dan kritik yang bersifat membangun sangat Penulis harapkan. Semoga tulisan ini dapat memberikan manfaat bagi Penulis dan semua orang yang membaca tulisan ini. Aamiin.

Penulis

Afifah Nur Falah Madani Pertiwi

**PRODUKSI DAN KARAKTERISASI ENZIM KOLAGENASE
DARI BAKTERI LAUT MENGGUNAKAN SUBSTRAT KOLAGEN
KULIT IKAN IKAN NILA (*Oreochromis niloticus*)**

AFIFAH NUR FALAH MADANI PERTIWI
H031201050

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 NILA (*Oreochromis niloticus*)**

AFIFAH NUR FALAH MADANI PERTIWI
H031201050

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 Nila (*Oreochromis niloticus*)" 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



Afifah Nur Falah Madani Pertiwi
H031201050

ABSTRAK

AFIFAH NUR FALAH MADANI PERTIWI. **Produksi dan Karakterisasi Enzim Kolagenase dari Bakteri Laut Menggunakan Substrat Kolagen Kulit Ikan Nila (*Oreochromis Niloticus*)** (dibimbing oleh Hasnah Natsir).

Latar Belakang. Enzim kolagenase merupakan satu-satunya enzim yang dapat menghidrolisis ikatan peptida dalam protein kolagen asli di bawah berbagai kondisi fisiologis dan menghancurkannya menjadi fragmen-fragmen yang kecil. Enzim kolagenase memiliki fungsi penting terutama pada bidang industri dan kesehatan. **Tujuan.** Penelitian ini bertujuan untuk menentukan waktu optimum produksi, menguji aktivitas dan karakterisasi enzim kolagenase dari bakteri laut menggunakan substrat kolagen kulit ikan nila (*Oreochromis niloticus*). **Metode.** Penelitian ini terdiri dari beberapa tahapan, diantaranya: (1) ekstraksi kolagen dari kulit ikan nila; (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 memiliki aktivitas kolagenase dan enzim kolagenase dapat menghidrolisis kolagen.

Kata kunci: Bakteri laut; Kolagen; Kolagenase; *Oreochromis niloticus*

ABSTRACT

AFIFAH NUR FALAH MADANI PERTIWI. **Production and Characterization of Collagenase Enzyme From Marine Bacteria Using Collagen Substrate in Tilapia Skin (*Oreochromis niloticus*)** (supervised by Hasnah Natsir).

Background. The collagenase enzyme is the only enzyme that can hydrolyze peptide bonds in native collagen protein under various physiological conditions and destroy them into small fragments. The collagenase enzyme has an important function, especially in the industrial and health sectors. **Aims.** This research aims to determine the optimum production time, test the activity and characterization of the collagenase enzyme from marine bacteria using tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin collagen as a substrate. **Methods.** This research consisted of several stages, including: (1) collagen extraction from tilapia 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.** Marine bacteria have great collagenolytic activity. The collagenase enzyme has collagenase activity and is influenced by pH, temperature, substrate concentration and metal ions. **Conclusion.** Marine bacteria have collagenase activity and the collagenase enzyme can hydrolyze collagen.

Keywords: Collagen; Collagenase; Marine bacteria; *Oreochromis niloticus*

DAFTAR ISI

	Halaman
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	2
1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian	2
1.3.1 Maksud Penelitian	2
1.3.2 Tujuan Penelitian	2
1.4 Manfaat Penelitian	2
BAB II METODE PENELITIAN	3
2.1 Bahan Penelitian	3
2.2 Alat Penelitian	3
2.3 Waktu dan Tempat Penelitian	3
2.4 Prosedur Penelitian	3
2.4.1 Ekstraksi Kolagen Kulit Ikan Nila Sebagai Substrat	3
2.4.2 Pembuatan Media	4
2.4.3 Peremajaan Isolat Bakteri Laut	5
2.4.4 Uji Kolagenolitik Bakteri Laut	5
2.4.5 Persiapan Inokulum	5
2.4.6 Penentuan Waktu Produksi Optimum Enzim Kolagenase	5
2.4.7 Penentuan Aktivitas Enzim Kolagenase	6
2.4.8 Penentuan Kadar Protein Enzim Kolagenase	6
2.4.9 Produksi Enzim Kolagenase	6
2.4.10 Karakterisasi Enzim Kolagenase	7
2.4.11 Hidrolisis Kolagen Kulit Ikan Nila	7
BAB III HASIL DAN PEMBAHASAN	8

3.1 Ekstraksi Kolagen Kulit Ikan Nila Sebagai Substrat	8
3.2 Uji Kolagenolitik Bakteri Laut	10
3.3 Penentuan Waktu Produksi Optimum Enzim Kolagenase	10
3.4 Karakterisasi Enzim Kolagenase	11
3.5 Hidrolisis Kolagen Kulit Ikan Nila	12
BAB IV KESIMPULAN DAN SARAN	14
4.1 Kesimpulan	14
4.2 Saran	14
DAFTAR PUSTAKA.....	15
LAMPIRAN	28

DAFTAR TABEL

Nomor		Halaman
1.	Komposisi media produksi sebanyak 100 mL.....	5

DAFTAR GAMBAR

Nomor	Halaman
1. Reaksi NaOH dengan protein	8
2. Kolagen kulit ikan nila	8
3. Spektrum IR kolagen komersial (a) dan kolagen kulit sampel (b)	9
4. Uji kolagenolitik bakteri laut isolat Sed 1.a 2% dan Sed 2.c.....	10
5. Hidrolisis kolagen oleh enzim kolagenase	12
6. Reaksi hidrolisis kolagen oleh enzim kolagenase.....	13

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor		Halaman
1.	Diagram Alir Penelitian.....	20
2.	Prosedur Penelitian	21
3.	Peta Lokasi Pengambilan Sampel.....	32
4.	Perhitungan Pembuatan Larutan.....	33
5.	Dokumentasi Penelitian.....	36

DAFTAR SIMBOL DAN SINGKATAN

Simbol/singkatan	Arti dan Penjelasan
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
FTIR	<i>Fourier Transform Infra Red</i>
mM	Milimolar
OD	<i>Optical Density</i>
pH	<i>Potential of Hydrogen</i>
Rpm	<i>Rotation per minute</i>
TCA	<i>Trichloroacetic Acid</i>
U/mL	Unit per mililiter
μL	Mikroliter
α	Alpha
β	Beta
λ	Panjang Gelombang

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Perkembangan ilmu bioteknologi saat ini telah menempatkan pemanfaatan enzim sebagai salah satu alternatif untuk berbagai keperluan, terutama dalam bidang industri dan kesehatan (Noviyanti et al., 2012). Enzim merupakan sekelompok protein yang memiliki peran sebagai katalis dan mengatur perubahan senyawa kimia dalam sistem biologis (Sulistiyowati et al., 2016). Salah satu enzim yang telah banyak dipelajari adalah enzim protease. Enzim protease merupakan enzim yang berfungsi mengkatalis hidrolisis ikatan peptida pada protein (Fathimah dan Wardani, 2014).

Enzim protease memiliki salah satu sub-kelompok yang menarik yaitu enzim kolagenase. Enzim kolagenase merupakan satu-satunya enzim yang dapat menghidrolisis ikatan peptida dalam protein kolagen asli di bawah berbagai kondisi fisiologis dan menghancurkannya menjadi fragmen-fragmen yang kecil (Sartika et al., 2019). Enzim kolagenase dari berbagai sumber memiliki sifat katalitik yang berbeda-beda, perbedaan tersebut disebabkan oleh beberapa faktor seperti spesies, umur, jenis makanan, kualitas air, dan suhu lingkungan (Rochima et al., 2017). Sumber bahan baku enzim kolagenase yang terdapat pada mikroorganisme laut memiliki efisiensi katalitik yang tinggi dibandingkan mikroorganisme darat. Oleh karena itu, enzim kolagenase yang diperoleh dari bakteri laut mendapatkan perhatian khusus karena sifatnya yang beragam (Yang et al., 2017).

Enzim kolagenase menggunakan kolagen sebagai substratnya untuk memecahkan ikatan peptida dalam rantai polipeptida kolagen (Febrina et al., 2022). Menurut Holwerda dan Loon (2022) kolagen adalah protein yang paling banyak terdapat dalam jaringan hewan dengan proporsi 30% dari total protein tubuh komponen utama dari jaringan ikat, otot, gusi, dan kulit. Kolagen terdiri dari tiga α rantai polipeptida yang bergabung membentuk struktur *triple helix* di matriks ekstraseluler (Sartika et al., 2019). Kolagen pada bidang industri saat ini sudah banyak dikembangkan, namun sebagian besar berasal dari tulang dan kulit babi atau sapi. Astiana et al., (2016) menyatakan bahwa kolagen dapat dihasilkan dari hewan lain yaitu ikan. Ikan memiliki struktur molekul yang lebih kecil dibandingkan dengan kolagen yang terbuat dari sapi maupun babi, sehingga kolagen yang dikonsumsi lebih mudah diserap oleh tubuh. Salah satu ikan yang berpotensi menghasilkan kolagen adalah ikan nila (Hasan et al., 2020).

Ikan nila (*Oreochromis niloticus*) merupakan salah satu spesies ikan yang paling banyak dibudidayakan hingga saat ini (Sukreni et al., 2024). Data statistik (Kementerian Kelautan dan Perikanan, 2021) menyebutkan bahwa produksi ikan nila di Indonesia menempati posisi tertinggi dengan produktivitas mencapai 9.885.400,32 ton. Hal ini dapat disebabkan karena Indonesia merupakan negara kepulauan dengan kekayaan sumber daya perairannya yang sangat melimpah. Selain itu, data dari (*Destructive Fishing Watch* Indonesia, 2020) menyebutkan bahwa tingkat konsumsi ikan masyarakat Indonesia dapat mencapai 54,49 kilogram

per kapita. Kulit ikan nila mengandung sejumlah besar produk sampingan yang tidak dapat dimakan, namun limbah ini dapat digunakan sebagai substrat yang sangat baik untuk memproduksi peptida kolagen (Verde et al., 2021). Penelitian menunjukkan bahwa penggunaan limbah kulit ikan dapat memberikan manfaat lebih dari 40% dari hasil berat kering kolagen itu sendiri (Elbialy et al., 2020).

Penelitian terkait mengenai produksi enzim kolagenase telah dilakukan oleh Sihombing et al., (2022) mengenai produksi enzim kolagenase dari organ dalam ikan nila dengan nilai aktivitas enzim kolagenase tertinggi diperoleh pada suhu 55 °C sebesar 0,326 U/mL. Selain itu, penelitian lain oleh Gautam dan Azmi (2017) mengenai enzim kolagenase dari bakteri *Pseudomonas* sp. memiliki aktivitas enzim kolagenase sebesar 0,229 U/mL pada suhu dan pH optimum 6,5 dan 37 °C.

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka penelitian tentang produksi dan karakterisasi enzim kolagenase dari bakteri laut menggunakan substrat kolagen kulit ikan nila (*Oreochromis niloticus*) perlu dilakukan karena banyaknya pengaplikasian enzim kolagenase pada berbagai bidang terutama bidang industri dan kesehatan serta limbah kulit ikan nila yang dapat dimanfaatkan. Penelitian ini bermanfaat untuk mendapatkan informasi sehingga dapat mengaplikasikan enzim kolagenase sesuai dengan sifat dan karakterisasinya tersebut dan memanfaatkan bakteri laut dan kulit ikan nila sebagai alternatif sumber kolagenase dan substrat kolagen.

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 nila?
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 penelitian ini adalah untuk mengoptimalkan produksi dan karakterisasi enzim kolagenase dari bakteri laut menggunakan substrat kolagen kulit ikan nila.

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 nila
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 nila menjadi kolagen

BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit ikan nila, bakteri laut isolat Sed 1.a dan Sed 2.c, *nutrient agar*, *agar base*, *yeast*, *yeast extract*, pepton, *bacto pepton*, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Merck), KH_2PO_4 (Merck), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck), NaOH (Merck), CH_3COOH (Merck), NaCl (Merck), KBr (Merck), KCl (Merck), MgCl_2 (Merck), HgCl_2 (Merck), CaCl_2 (Merck), BSA, CuSO_4 (Merck), Na-K-Tatrat, *folin-ciocalteu* (Merck), Na_2CO_3 (Merck), TCA, buffer fosfat, buffer sitrat, *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 μL), 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), dan spektrofotometri UV-Vis, dan peralatan gelas yang umum digunakan di laboratorium.

2.3 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari - Juni 2024 di Laboratorium 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 *Maros Aquaculture*, Jl. Poris Kariango, Kabupaten Maros, Sulawesi Selatan.

2.4 Prosedur Penelitian

2.4.1 Ekstraksi Kolagen Kulit Ikan Nila Sebagai Substrat

a. Preparasi Sampel (Romahdhon et al., 2019; Sahubawa dan Putra, 2011)

Proses ekstraksi kolagen kulit ikan nila diawali dengan preparasi sampel. Kulit ikan nila dibersihkan dari kotoran yang menempel dan dipotong-potong dengan ukuran 1 cm x 1 cm. Kemudian dicuci hingga bersih.

b. Ekstraksi Kolagen (Romahdhon et al., 2019)

Tahap pertama ekstraksi kolagen yaitu praperlakuan dengan larutan NaOH. Sampel kulit ikan nila ditimbang sebanyak 100 gram, kemudian direndam dalam NaOH 0,1 M dengan rasio 1:10 (b/v) pada suhu ruang selama 24 jam. Sampel kemudian disaring menggunakan kain katun tipis dan dicuci menggunakan akuades hingga pH netral.

Tahap kedua yaitu ekstraksi kolagen yang dilakukan dengan cara merendam sampel dalam larutan CH_3COOH 0,5 M dengan rasio 1:10 (b/v) pada suhu ruang

selama 3x24 jam. Hasil ekstraksi disaring menggunakan kain katun tipis untuk memisahkan residu dan supernatan. Kemudian supernatan dipresipitasi dengan menambahkan NaCl 0,9 M (proses *salting out*) selama 24 jam. Presipitat disentrifugasi pada 8.000 rpm selama 30 menit. Hasil yang diperoleh selanjutnya dikering-bekukan dengan *freeze dryer* selama 24 jam untuk diperoleh kolagen kering. Kolagen yang dihasilkan kemudian dilakukan penimbangan bobot untuk mengetahui jumlah rendemen yang dihasilkan. 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; Nurhayati, 2013)

Karakterisasi kolagen yang dilakukan yaitu uji gugus fungsi menggunakan FTIR. Kolagen sebanyak 2 mg dan KBr sebanyak 200 mg digerus hingga homogen. Kemudian dicetak pada alat pencetak disk dan divakum untuk menghilangkan udara pada disk. Disk yang telah dicetak dimasukkan ke dalam alat FTIR. Sinar inframerah ditembakkan dari spektrofotometer dengan IR-400 cm⁻¹ sampai 4.000 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 °C selama 15 menit. Kemudian media dalam keadaan hangat dituang ke dalam cawan petri steril, dan didiamkan sampai media mengeras.

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

Substrat kolagen sebanyak 0,1 g, *agar base* sebanyak 2 g, *yeast* sebanyak 0,5 g, pepton sebanyak 0,5 g, 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 °C selama 15 menit. Kemudian, dalam keadaan hangat dituang ke dalam cawan petri steril, dan didiamkan sampai media mengeras. Prosedur yang sama dilakukan untuk 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 NaCl sebanyak 0,1 g dilarutkan dengan 100 mL air laut steril dalam Erlenmeyer 250 mL. Selanjutnya media disterilkan dalam *autoclave* pada suhu 121 °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 ₄) ₂ SO ₄	0,7 g
5.	KH ₂ PO ₄	0,1 g
6.	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,01 g
7.	CaCl ₂	0.01 g
8.	Substrat kolagen	1 mL
9.	Air laut steril	99 mL

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

Isolat bakteri laut isolat Sed 1.a diremajakan pada media peremajaan. Sebanyak satu ose koloni digores dengan metode kuadran pada media peremajaan dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Prosedur yang sama dilakukan dengan menggunakan isolat Sed 2.c.

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

Isolat bakteri laut yang telah diremajakan diambil sebanyak satu ose kemudian digoreskan pada media substrat, selanjutnya diinkubasi pada suhu 37 °C selama 3x24 jam. Aktivitas kolagenolitik diamati setiap 1x24 jam. Adanya zona bening menunjukkan isolat tersebut menghasilkan enzim kolagenase. Diameter zona bening diukur dan dihitung indeks kolagenolitik 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 Produksi Optimum 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). kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 96 jam dengan pengocokan 150 rpm. Penentuan waktu optimum produksi kolagenase dilakukan dengan pengambilan sampel setiap 12 jam. *Optical density* (OD) ditentukan dengan mengukur serapan pada panjang gelombang 660 nm. Selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 3.500 rpm dengan suhu 4 °C selama 30 menit. Supernatan dikumpulkan sebagai ekstrak kasar enzim kolagenase. Kemudian dilakukan uji aktivitas enzim kolagenase dan kadar protein.

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

Aktivitas kolagenase dilakukan berdasarkan metode Bergmeyer (1983) yang diuji dengan mereaksikan buffer fosfat 0,2 M (pH 7,0) sebanyak 1 mL, larutan enzim sebanyak 0,2 mL, dan substrat kolagen 2% sebanyak 1 mL ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya, diinkubasi pada suhu 37 °C selama 10 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan TCA 0,1 M sebanyak 2 mL, kemudian ditambahkan akuades sebanyak 0,2 mL. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37 °C selama 10 menit dan dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk dipipet sebanyak 1,5 mL, lalu dicampur dengan Na₂CO₃ 0,4 M sebanyak 5 mL dan *folin-ciocalteu* (2:1) sebanyak 1 mL. Kemudian dидiamkan selama 20 menit pada suhu 37 °C. Aktivitas enzim diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 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 = Jumlah enzim yang menyebabkan perubahan 1 µmol substrat/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 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 panjang gelombang 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 dikumpulkan sebagai ekstrak kasar enzim kolagenase. Kemudian diukur volume hasil produksi dan dilakukan karakterisasi enzim kolagenase.

2.4.10 Karakterisasi Enzim Kolagenase

a. Pengaruh pH (Wu et al., 2010)

Pengaruh pH pada aktivitas kolagenase ditentukan dengan 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 dan diukur aktivitasnya menggunakan metode Bergmeyer (1983) sebanyak tiga kali ulangan (triplo).

b. Pengaruh Suhu (Wu et al., 2010)

Pengaruh suhu pada aktivitas kolagenase ditentukan dengan 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 (Abood et al., 2018)

Pengaruh konsentrasi substrat pada aktivitas kolagenase ditentukan dengan 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 (Abood et al., 2018)

Pengaruh ion logam terhadap aktivitas kolagenase ditentukan dengan cara penambahan ion logam monovalen (Na^+ dan K^+) dan divalen (Ca^{2+} , Mg^{2+} , dan Hg^{2+}). Reaksi dilakukan dengan pra-inkubasi kolagenase dengan ion logam pada konsentrasi 5 dan 10 mM 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 Nila (Rori et al., 2020)

Enzim yang telah diproduksi diambil sebanyak 10 μL dan 20 μL , kemudian ditetaskan 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.