

Purifikasi Dan Karakterisasi Enzim Kolagenase Dari *Bacillus* Sp. KUB BPPT CC Dengan Menggunakan Substrat Kolagen Dari Kulit Ceker Ayam

Melia Febrina^{1*}, Siswa Setyahadi², Churiyah³

^{1,2,3}Fakultas Farmasi, Universitas Pancasila, Jakarta, Indonesia

*Email: melia_birth86@yahoo.co.id

Abstract

Collagenase is an endopeptidase that can break the triple helix domain of collagen. The main source of substrate used in this study is chicken claws skin, to utilize waste from chicken slaughterhouse with a considerable amount. Chicken claw is one part of the chicken body that is less desirable. Consisting of component of skin, muscle and bone with high collagen content of the skin. Characteristic of collagen from different source produce different collagenase enzyme characteristic. So, it takes information about enzyme characteristic and optimum enzyme activity. The aim of this study is to extraction collagen, characterization collagen, determination of molecular weight, produce collagenase, purification to collagenase enzyme and the characterization of crude and pure collagenase enzymes. Collagenase production using Luria Luria Bertani Broth (LB) liquid media and add 5% chicken claw skin. Fermentation with Bacillus sp. KUB BPPT CC with various of time 24,36 and 48 hours. The optimum production time is 36 hours with collagenase activity of 0,1001U/ml. The purification of the enzymes is carried out by precipitation of ammonium sulphate starting from 0 to 80% concentration, where the optimum activity result with 60% ammonium sulphate precipitation, followed DEAE Sephadex A-50 column chromatography. Precipitation with ammonium sulphate resulted in purification of 2,43-fold. After purification with the DEAE Sephadex A-50 coloumn, the enzyme was purified 11,21-fold. The molecular weight of the collagenase enzyme is 42kDa. Optimum activity of crude and pure collagenase at 50°C. The crude enzyme has an optimum pH of 10, while the enzymes is purified at pH 7. In testing the activity of collagenase used substrate derived from chicken claw skin. Collagen extraction method is classified into collagen soluble with collagen. Characterization is collagen value of 9,475%; pH value of 6,8; 5% water content; 0,6% ash content; 0,425 mg/ml protein content and collagen molecular weight is 130kDa.

Keywords: collagen; collagenase enzyme; enzyme purification; characterization

Abstrak

Kolagenase merupakan endopeptidase yang dapat memecah domain *triple helix* dari kolagen. Sumber utama substrat kolagen yang digunakan pada penelitian ini adalah kulit ceker ayam, untuk memanfaatkan limbah dari Rumah Potong Ayam dengan jumlah cukup banyak. Ceker ayam merupakan salah satu bagian dari tubuh ayam yang kurang diminati, terdiri atas komponen kulit, otot dan tulang dengan kandungan kolagen yang tinggi pada bagian kulit. Karakteristik kolagen dari sumber yang berbeda menghasilkan karakteristik enzim kolagenase yang berbeda pula. Sehingga dibutuhkan informasi mengenai karakteristik enzim dan aktivitas enzim yang optimum. Penelitian ini bertujuan untuk ekstraksi kolagen, penentuan berat molekul kolagen, karakterisasi kolagen, produksi kolagenase, pemurnian enzim kolagenase, karakterisasi enzim kolagenase crude dan murni. Produksi kolagenase dengan menggunakan media *Luria Bertani Broth* (LB) cair dan menambahkan 5% kulit ceker ayam. Fermentasi dengan *Bacillus* sp. KUB BPPT CC dengan variasi waktu 24, 36 dan 48

jam. Waktu produksi optimum adalah 36 jam dengan aktivitas kolagenase 0,1001 U/ml. Pemurnian enzim dilakukan dengan presipitasi amonium sulfat mulai dari konsentrasi 0 hingga 80%, dimana hasil aktivitas optimum dengan presipitasi amonium sulfat 60% (b/v), dilanjutkan dengan kromatografi kolom DEAE Sephadex A-50. Pengendapan dengan amonium sulfat mengakibatkan pemurnian 2,43 kali lipat. Setelah pemurnian dengan kolom DEAE Sephadex A-50, enzim dimurnikan 11,21 kali lipat. Berat molekul enzim kolagenase 42 kDa. Aktivitas optimum kolagenase *crude* dan murni pada suhu 50°C. Enzim *crude* memiliki pH optimum 10, sedangkan enzim yang dimurnikan pada pH 7. Pada pengujian aktivitas kolagenase digunakan substrat yang berasal dari kulit ceker ayam. Metode ekstraksi kolagen tergolong kedalam kolagen larut asam dengan uji kolagen yaitu Nilai rendemen kolagen 9,475%, Nilai pH 6,8, Kadar air 5%, Kadar Abu 0,6%, Kadar protein 0,425 mg/ml dan Berat molekul kolagen 130 kDa .

Kata Kunci: kolagen; enzim kolagenase; pemurnian enzim; karakterisasi

1. PENDAHULUAN

Enzim kolagenase adalah enzim proteolitik yang spesifik menghidrolisa protein kolagen dan tidak dapat memecah protein jenis lain (Beynon & Bond, 2000), sehingga kecil kemungkinan merusak jaringan. Enzim kolagenase memiliki banyak manfaat diantaranya pada bidang medis, eksperimen biologi molekuler dan industri makanan (Baekhaki, 2012). Pemanfaatan enzim kolagenase dalam bidang medis yaitu perbaikan radang pada jaringan, transplantasi klinis, fungsi seluler dalam penggumpalan darah, fibrinolisis dan fertilisasi serta mempercepat penyembuhan luka.

Enzim kolagenase diperoleh dari hasil fermentasi bakteri dengan menggunakan substrat tertentu. Adapun bakteri penghasil enzim kolagenase yang telah diteliti yaitu *Bacillus subtilis* FS-2, *Bacillus subtilis* CN2, *Bacillus* sp.MO-1, *Bacillus pumilus* CoI-J, *Bacillus subtilis* ASI.398, *Streptomyces* sp. Strain 3B dan *Streptomyces parvulus*. Pertimbangan penggunaan bakteri sebagai sumber enzim karena pertumbuhannya relatif cepat, ramah lingkungan, mudah diisolasi dan terbuka peluang untuk meningkatkan mutu enzim melalui rekayasa genetik (Rahmiati, 2004).

Substrat yang digunakan dalam pembentukan enzim kolagenase adalah substrat yang mengandung kolagen. Kolagen bersifat *biodegradable* dan berperan dalam pembentukan jaringan, organ dan ekspresi fungsional sel. Sumber

utama kolagen komersial berasal dari sapi dan babi. Namun, penggunaannya menimbulkan kekhawatiran karena merebaknya *Bovine Spongiform Encephalopathy* (BSE), *Transmissible Spongiform Encephalopathy* (TSE) dan *Foot and Mouth Disease* (FMD) pada sapi. Selain itu, terdapat unsur agama yang tidak memperbolehkan penggunaan babi sebagai sumber kolagen. Pada penelitian ini akan digunakan kulit ceker ayam sebagai sumber kolagen karena belum ada pemanfaatan menggunakan kulit ceker ayam sebagai substrat untuk produksi enzim kolagenase.

Ceker ayam (*shank*) merupakan limbah (*by product*) dari rumah potong ayam (RPA) dengan volume cukup banyak (Miwada & Simpen, 2007). Berdasarkan data Kementerian Pertanian Republik Indonesia bahwa jumlah produksi daging ayam ras pedaging di Indonesia terus meningkat, dimana pada tahun 2013 sebanyak 1.497.873 ekor, tahun 2014 sebanyak 1.544.379 ekor, tahun 2015 sebanyak 1.628.307 ekor dan tahun 2016 sebanyak 1.905.497 ekor ayam ras pedaging di Indonesia. Setiap tahun, jumlah ceker aya terus meningkat seiring meningkatnya jumlah permintaan konsumen terhadap daging ayam.

Ceker ayam merupakan salah satu bagian dari tubuh ayam yang kurang diminati, terdiri atas komponen kulit, otot dan tulang dimana kandungan kolagen yang tinggi pada bagian kulit. Kulit ceker

ayam memiliki komposisi kimia seperti kadar air 65.9%, protein 22.98%, lemak 5.6%, abu 3.49% dan bahan lain 2.03%. Tingginya kandungan protein pada ceker ayam membuka peluang pemanfaatannya untuk menambah nilai ekonomi dari ceker ayam.

Penelitian mengenai purifikasi dan karakterisasi enzim kolagenase dari *Bacillus* sp. KUB BPPT CC dengan menggunakan substrat kolagen dari kulit ceker ayam perlu dilakukan, untuk memanfaatkan limbah dari rumah potong ayam dengan volume cukup banyak. Pengembangan produk berbasis kolagen perlu didukung oleh kualitas kolagen yang memiliki karakteristik sesuai standar. Karakteristik kolagen dari sumber yang berbeda menghasilkan karakteristik enzim kolagenase yang berbeda pula. Sehingga dibutuhkan informasi mengenai karakteristik enzim dan aktivitas enzim yang optimum. Oleh karena itu, diperlukan purifikasi dan karakterisasi terhadap kolagenase ekstraseluler dari isolat terpilih yaitu *Bacillus* sp. KUB BPPT CC karena bakteri genus *Bacillus* adalah bakteri penghasil enzim kolagenase yang paling sering digunakan serta kemampuan degradasi kolagen sehingga penggunaannya dapat dimaksimalkan (Scopes, 1987). Sebagai produk bioteknologi, kolagenase ini dapat digunakan sebagai alternatif enzim baru, sebab sumber-sumber enzim baru masih diperlukan.

2. METODE

A. Metode yang digunakan

1. Ekstraksi Kolagen

Tahapan ekstraksi kolagen berdasarkan metode Nagai dan Suzuki (Nagai & Suzuki, 2000) yang telah dimodifikasi. Selanjutnya dilakukan karakterisasi kolagen dari kulit ceker ayam

2. Peremajaan Isolat

Isolat *Bacillus* sp. KUB BPPT CC diremajakan pada media agar *Luria bertani broth* (LB) kemudian diinkubasi 37°C selama 24 jam.

3. Pembuatan Inokulum

Dilakukan dengan menumbuhkan isolat pada media cair *Luria bertani broth*

(LB) hingga *optical density* (OD) mencapai 0,8. Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C dengan agitasi sebesar 150 rpm. Pengukuran *optical density* (OD) dilakukan pada $\lambda = 600$ nm.

4. Produksi Enzim Kolagenase

Dilakukan dengan menambahkan 10% inokulum yang memiliki OD 0.8 pada media cair *Luria bertani broth* (LB) dan 5% kulit ceker ayam. Inkubasi dilakukan dengan variasi waktu 24, 36 dan 48 jam pada pH 7, suhu 37°C dan agitasi 150 rpm. Kemudian disentrifugasi untuk pemisahan sel dengan kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang diperoleh merupakan ekstrak kasar enzim. Selanjutnya dilakukan uji aktivitas enzim kolagenase dan kadar protein.

5. Pemurnian Enzim kolagenase

Bertujuan untuk memisahkan enzim kolagenase dari berbagai senyawa yang lain. Tahap pemurnian dilakukan mulai dari produksi untuk menghasilkan enzim ekstrak kasar; pengendapan dengan amonium sulfat, digunakan amonium sulfat karena sifatnya yang mudah larut, murah dan umumnya tidak mempengaruhi struktur protein pada konsentrasi tertentu; dialisis untuk menghasilkan enzim kolagenase semi murni dan mengurangi kadar garam (desalting) yang tersisa dari pengendapan; kromatografi kolom pertukaran ion untuk menghasilkan enzim kolagenase yang lebih murni (Nurhayati, et al., 2010).

6. Penentuan berat molekul

Dilakukan menggunakan SDS-PAGE (*Sodium Dodecil Sulfate Polyacrilamide Gel Elektroforesis*) dan zimogram. Pada pembuatan gel SDS-PAGE dan zimogram baik *separating gel* 12% dan *stacking gel* 4% ditambahkan amonium persulfat dan TEMED (*N,N, N',N'-tertramethylen-ethylenediamine*). Sedangkan zimogram bertujuan untuk menganalisis aktivitas proteolitik dengan menambahkan substrat protein pada *separating gel*. Sedangkan perlakuan terhadap sampel yaitu dengan menambahkan *loading buffer* disertai pemanasan untuk proses denaturasi. Marker protein yang digunakan yaitu Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder yang dapat mendeteksi berat molekul suatu protein antara 10-260 kDa.

7. Karakterisasi enzim kolagenase

Bertujuan untuk mengetahui kondisi optimal enzim kolagenase sehingga aplikasi penggunaannya dapat disesuaikan dengan karakter tersebut. Karakterisasi kolagenase meliputi pengaruh suhu dan pH terhadap aktivitas dan stabilitas enzim.

B. Bahan dan alat yang digunakan

1. Bahan penelitian

Bahan utama yang digunakan pada penelitian adalah kulit ceker ayam dan isolat bakteri *Bacillus* sp. KUB BPPT CC. Bahan kimia yang digunakan untuk pembuatan kolagen adalah etanol 50%, NaOH, CH₃COOH, NaCl, Tris (*hydroxymethyl*) aminomethane. Bahan kimia yang digunakan untuk memproduksi enzim kolagenase antara lain pepton, *yeast extract powder*, dan NaCl. Bahan kimia yang digunakan untuk uji aktivitas enzim kolagenase dan uji analisis kadar protein adalah buffer fosfat, TCA (*trichloroacetic acid*), Na₂CO₃, pereaksi folin ciocalteau (1:2), *comassie brilliant blue G-250*, etanol, *ortho-phosphoric acid*, L-tyrosin, *bovine serum albumin*. Untuk pemurnian enzim kolagenase antara lain ammonium sulfat teknis, DEAE (diethylaminoetil) Sephadex A-50 dan buffer fosfat, NaCl 1 M. Untuk karakterisasi enzim kolagenase digunakan buffer fosfat, buffer Tris-HCL, buffer glisin-NaOH. Reagen untuk SDS-PAGE dan zimogram adalah Tris Cl, Akrilamid 30%, APS 10% dan TEMED.

2. Alat penelitian

Alat-alat penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah timbangan analitik, homogenizer, kantong dialisis, *rotary shaker*, stirer, mikropipet dan tip, *autoclave*, *Laminar Air Flow*, pH meter, sentrifugasi dingin, spektrofotometer, inkubator, peralatan elektroforesis SDS-PAGE, peralatan kromatografi (kolom dan *fraction collector*) serta peralatan gelas.

C. Sampel dan Obyek Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian adalah kolagen dan enzim kolagenase. Obyek penelitian ini adalah uji kolagen, aktivitas enzim kolagenase, analisis kadar protein, karakterisasi enzim kolagenase dan penentuan berat molekul.

D. Teknik Pengumpulan Data

Data diperoleh dari pengamatan dan pemeriksaan pengujian kolagen, aktivitas enzim kolagenase, analisis kadar protein, karakterisasi enzim kolagenase dan penentuan berat molekul. Data aktivitas enzim kolagenase diperoleh dengan menggunakan spektrofotometer pada $\lambda = 578$ nm. Data analisis kadar protein dengan cara mengukur absorbannya pada $\lambda = 595$ nm. Uji kolagen berdasarkan Standar Nasional Indonesia mengacu SNI 8076:2014. Untuk penentuan berat molekul dilakukan dengan menggunakan SDS PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamide Gel Elektrophoresis*) dan Zimogram.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Ekstraksi dan Uji karakterisasi kolagen

Ekstrak kolagen yang diperoleh merupakan kolagen larut asam (*Acid Soluble Collagen*) (Kasim, 2013). Hasil ekstraksi yang diperoleh dilakukan freeze drying dan dilakukan uji karakterisasi kolagen diantaranya:

1. Rendemen kolagen

Rendemen kolagen merupakan persentase kolagen yang dihasilkan dari berat bahan baku awal. Rendemen juga berguna untuk mengetahui keefektifan proses ekstraksi. Berat baku awal kulit ceker ayam 20 g setelah diekstraksi menghasilkan kolagen kering 1,895 g. Kolagen kulit ceker ayam memiliki rendemen 9,48%.

2. Nilai pH

Nilai pH kolagen pada kulit ceker ayam adalah 6,8 dimana nilai pH tersebut sesuai SNI kolagen sebesar 6,5-8.

3. Kadar air

Nilai kadar air pada kolagen kulit ceker ayam pada penelitian ini adalah 5%, dimana kadar air sesuai SNI kolagen dengan nilai maksimum 12%.

4 Kadar Abu

Nilai kadar abu kolagen pada kulit ceker ayam pada hasil penelitian ini adalah 0,61. Hal ini sesuai dengan SNI kolagen bahwa kadar abu maksimal 1%.

5 Uji kadar protein pada kolagen

Kadar protein pada kolagen ditentukan dengan Uji Bradford. Tabel 1 merupakan kadar protein pada kolagen.

Tabel 1. Kadar protein pada kolagen

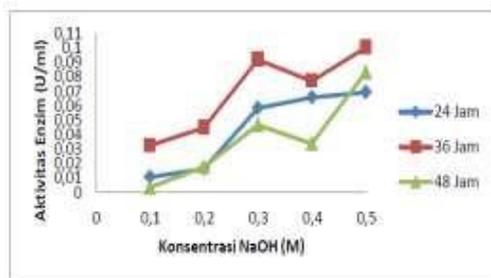
Konsentrasi NaOH	Kadar protein (mg/ml)
0.1 M	0.264
0.2 M	0.412
0.3 M	0.415
0.4 M	0.402
0.5 M	0.425

Kadar protein dari larutan NaOH kulit ceker ayam pada perlakuan konsentrasi NaOH 0,5M menunjukkan kandungan protein tertinggi yaitu 0,425 mg/ml. Larutan NaOH dapat mengurangi impuriti senyawa non kolagen dan mengeliminasi bau, sehingga memberikan kondisi optimal untuk ekstrasi kolagen.

B. Uji Aktivitas Enzim Kolagenase

Pengujian aktivitas menggunakan metode Bergmeyer et al (Bergmeyer, et al., 1983). dengan menggunakan substrat kolagen dari kulit ceker ayam. Satu unit aktivitas enzim kolagenase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dapat menghasilkan satu μmol produk tirosin per menit pada suhu tertentu dengan waktu 20 menit dan $\lambda = 578 \text{ nm}$. Tirosin digunakan sebagai standar pengukuran. Uji aktivitas enzim kolagenase dengan variasi waktu 24, 36 dan 48 jam dengan menggunakan substrat kolagen dengan konsentrasi 0.1; 0.2; 0.3; 0.4 dan 0.5 M NaOH.

Pada Gambar 1 memperlihatkan waktu produksi optimum untuk *Bacillus* sp. KUB BPPT CC pada jam ke-36 dengan aktivitas 0,1001U/ml dengan menggunakan konsentrasi NaOH 0.5M



Gambar 1. Uji aktivitas kolagenase dengan variasi waktu 24, 36 dan 48 jam

C. Uji Kadar protein pada kolagenase

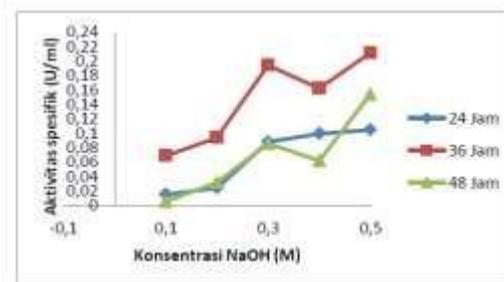
Penentuan kadar protein pada penelitian ini menggunakan metode Bradford (Bradford, 1976). Pemilihan metode ini dikarenakan pengerjaannya yang sangat sederhana, cepat, sensitif dan cukup akurat. Penentuan kadar protein ini digunakan untuk menghitung aktivitas spesifik dari suatu protein enzim.

Sedangkan profil aktivitas spesifik kolagenase pada jam ke 24, 36 dan 48 jam dengan substrat kolagen dan NaOH konsentrasi 0.1; 0.2; 0.3; 0.4 dan 0.5 M. Seperti yang tertera pada Tabel 2.

Tabel 2. Uji kadar protein pada kolagenase ekstrak kasar pada pengamatan 24, 36 dan 48 jam

Variasi Waktu	Kadar protein (mg/ml)
24 Jam	0.660
36 Jam	0.474
48 Jam	0.541

Pada Gambar 2 dari profil aktivitas spesifik kolagenase optimum pada ke 36 jam dengan substrat kolagen pada konsentrasi NaOH 0.5 M yaitu kadar protein 0.474 mg/ml, sehingga diperoleh aktivitas spesifik sebesar 0.2112 U/mg.



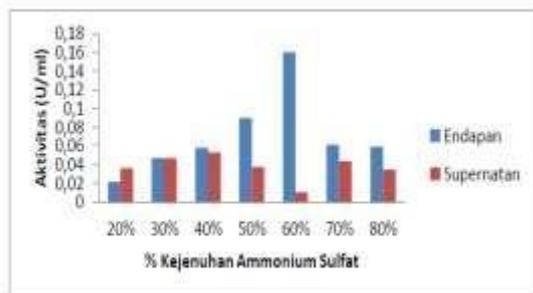
Gambar 2. Aktivitas spesifik kolagenase ekstrak kasar pada pengamatan 24, 36 dan 48 jam

D. Pemurnian Enzim

1. Pengendapan Amonium sulfat

Prosedur awal pemurnian yaitu dengan mengendapkan enzim kolagenase menggunakan amonium sulfat berdasarkan tabel scopes. Pada penelitian ini, filtrat kolagenase dipekatkan dengan garam amonium sulfat dengan tingkat kejenuhan 20- 80%.

Berdasarkan pada Gambar 3 dibawah ini dapat dilihat bahwa nilai aktivitas enzim lebih besar terdapat pada endapan dibandingkan supernatnya.

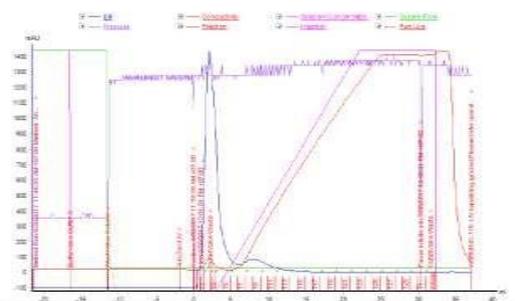


Gambar 4. Aktivitas enzim pada berbagai konsentrasi amonium sulfat (%)

Konsentrasi garam terbaik dalam mengendapkan protein kolagenase adalah 60% kejenuhan. Pada konsentrasi 60% kolagenase mencapai nilai optimal yaitu 0,1602 U/ml pada endapannya dan besarnya kadar protein setelah pengendapan enzim ini sebesar 0,312 mg/ml, sehingga diperoleh aktivitas spesifik enzim kolagenase sebesar 0,513 U/mg. Sedangkan pada supernatan memiliki aktivitas yang paling rendah yaitu 0,0103 U/ml. dan besarnya kadar protein setelah pengendapan sebesar 0,163 mg/ml, sehingga aktivitas spesifik sebesar 0,063 U/mg. Dengan demikian pada saat konsentrasi garam 60% tingkat kejenuhan protein ekstraseluler *Bacillus sp.*KUB BPPT CC diperkirakan sudah mengendap (*salting out*).

2. Kromatografi Pertukaran Ion

Digunakan untuk memisahkan protein berdasarkan muatannya. Dasar dari kromatografi pertukaran ion adalah ion bermuatan dapat dengan bebas dipertukarkan dengan ion yang memiliki tipe muatan yang sama. Protein yang memiliki muatan negatif dapat dipertukarkan dengan ion klorida. Seperangkat alat kromatografi penukar ion terdiri dari kolom transparan berukuran 1 ml yang dirangkai dengan selang yang menghubungkan eluen dengan kolom. Eluen yang digunakan adalah NaCl 1 M dalam buffer fosfat pH 8 dan matriks yang digunakan adalah DEAE Sephadex A-50. Hasil dialisis dimasukkan ke kolom DEAE Sephadex A-50. Fraksi-fraksi yang memiliki aktivitas kolagenase dikumpulkan dan disimpan pada lemari pendingin. Seperti yang dapat dilihat pada Gambar 4.



Dari profil elusi pemurnian enzim kolagenase *Bacillus sp.* KUB BPPT CC
Gambar 3. Profil elusi enzim kolagenase *Bacillus sp.* KUB BPPT CC dengan kolom DEAE Sephadex A-50.

terlihat adanya aktivitas enzim pada fraksi 1-8. Sehingga pada fraksi tersebut dilakukan pengukuran uji aktivitas dan kadar protein. Seperti yang dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil uji aktivitas enzim kolagenase dan uji kadar protein seelah pemurnian pertukaran ion.

Fraksi	Aktivitas (U/ml)	Kadar protein (mg/ml)
1	0,0348	0,154
2	0,2226	0,094
3	0,1164	0,274
4	0,0324	0,212
5	0,0389	0,283
6	0,0383	0,222
7	0,0394	0,114
8	0,0132	0,21

Pada Tabel 4 adalah tahap pemurnian kolagenase diawali dengan pengendapan amonium sulfat, tingkat kemurnian yang diperoleh sebesar 2.43 kali ekstrak kasar. Selanjutnya kromatografi kolom DEAE Sephadex A-50 memberikan tingkat kemurnian sampai 11.21 kali dibandingkan dengan enzim ekstrak kasar.

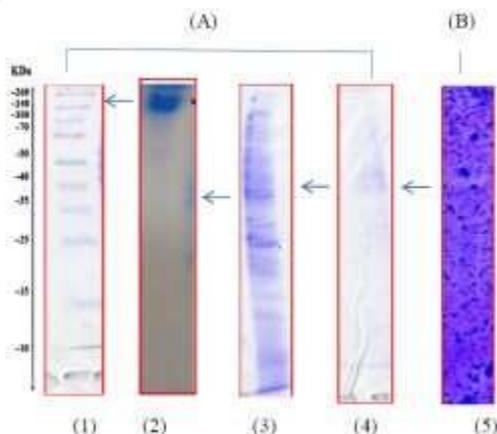
Tabel 4. Tahapan pemurnian kolagenase dari *Bacillus sp.* KUB BPPT CC

Tahapan Pemurnian	Aktivitas (U/ml)	Protein (mg/ml)	Volume (ml)	Total Aktivitas (Unit)	Total Protein (mg)	Aktivitas spesifik (U/mg)	Tingkat kemurnian (X)
Ekstrak kasar	0.1001	0.474	500	50.05	237	0.2112	1
(NH ₄) ₂ SO ₄ 60%	0.1602	0.312	2	0.3204	0.624	0.5135	2.43
DEAE Sephadex A-50 (Fraksi 2)	0.2226	0.094	1	0.2226	0.094	2.3681	11.21

E. Hasil Analisis SDS-PAGE dan Zimogram

Hasil pemurnian enzim kolagenase dapat dikonfirmasi melalui analisis SDS-PAGE dan zimogram untuk mengetahui seberapa murni enzim kolagenase yang diperoleh dan menentukan berat molekul dari protein enzim kolagenase.

Pergerakan protein dalam medan listrik hanya didasarkan pada ukuran molekul protein. Protein yang berukuran kecil akan bergerak lebih cepat dibandingkan dengan protein yang berukuran lebih besar. Massa molekul relatif (Mr) protein dapat diukur menggunakan protein standar (*marker protein*) yang telah diketahui Mr-nya dengan cara membandingkan nilai mobilitas relatif (R_f). R_f protein merupakan perbandingan jarak antara titik awal ke pita protein dengan jarak titik awal ke titik akhir elektroforesis. Pada Gambar 5, Lajur 1. Marker; Lajur 2. Kolagen; Lajur 3. Enzim ekstrak kasar; Lajur 4. Enzim murni DEAE Sephadex A-50; Lajur 5. Zimogram enzim murni DEAE Sephadex A-50



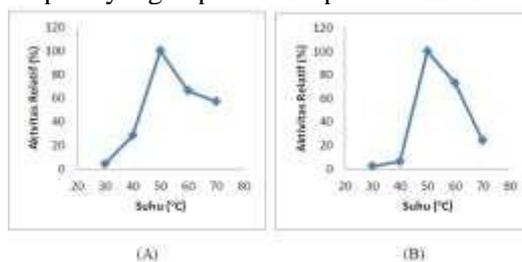
Gambar 5. Berat molekul kolagenase Bacillus sp. KUB BPPT CC (A) SDS-PAGE dan (B)

Dengan menggunakan SDS-PAGE, berat molekul kolagen diperoleh 130kDa. Adanya kolagen pada media produksi menginduksi fraksi-fraksi enzim kolagenase sehingga lebih aktif terhadap kolagen. Sedangkan berat molekul enzim kolagenase hasil pemurnian dengan DEAE Sephadex A-50 adalah 42 dan analisis zimogram menunjukkan kemampuan menghidrolisis kolagen dengan intensitas pita yang lebih nyata.

F. Karakterisasi Enzim Kolagenase *Crude* dan Murni

1. Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim Aktivitas enzim dengan variasi suhu

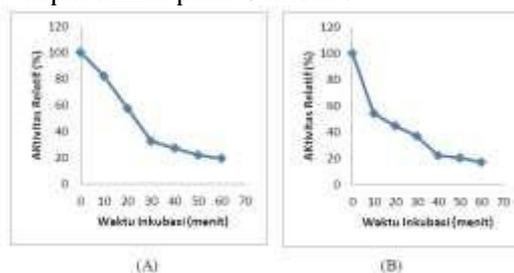
dari suhu 30°C sampai 70°C. Aktivitas tertinggi pada enzim *crude* dan enzim murni didapat pada suhu 50°C. Suhu optimum yang diperoleh dari penelitian yaitu 50°C. Hal tersebut terjadi karena suhu optimum tidak jauh berbeda dari suhu optimum produksi. Seperti yang dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Pengaruh suhu terhadap aktivitas kolagenase Bacillus sp. KUB BPPT CC (A) enzim *crude* dan (B) murni

2. Kestabilan pada suhu optimum

Pengujian kestabilan enzim *crude* dan murni diinkubasi pada suhu 50°C. Inkubasi dilakukan selama 10-60 menit. Hasil yang diperoleh bahwa enzim *crude* lebih stabil terhadap pemanasan pada suhu 50°C. Hal ini disebabkan adanya garam amonium sulfat yang berfungsi menstabilkan enzim. Grafiknya dapat dilihat pada Gambar 7.

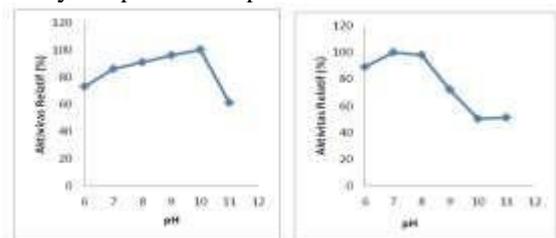


Gambar 7. Pengaruh suhu terhadap stabilitas enzim kolagenase Bacillus sp. KUB BPPT CC (A) enzim *crude* dan (B) murni

3. Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim

Pengaruh pH dilakukan dengan kisaran pH 6 sampai 11. Enzim *crude* memiliki aktivitas yang tinggi dengan pH optimum pada pH 10, sedangkan enzim murni pada pH 7. Pola grafik pengaruh pH terhadap aktivitas optimum enzim *crude* berbeda dengan aktivitas optimum enzim murni, hal ini disebabkan enzim murni telah kehilangan kofaktor dan garam-garam yang sebelumnya ada pada enzim *crude*.

Hasilnya dapat dilihat pada Gambar 8.

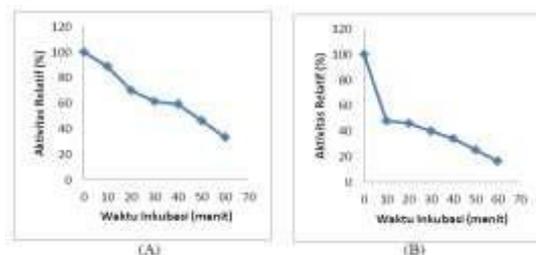


Gambar 8. Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim kolagenase *Bacillus* sp. KUB BPPT CC (A) enzim crude dan (B) enzim murni. Aktivitas kolagenase dilakukan pada suhu optimal (50°C)

4. Kestabilan pada pH optimum

Enzim murni lebih labil terhadap panas dibandingkan dengan enzim *crude*. Pemanasan selama 10-60 menit pada suhu 50°C aktivitasnya menurun hingga kurang dari 20% aktivitas residunya. Sedangkan enzim *crude* dengan pemanasan selama 10 menit aktivitas residu masih diatas 80% dan sampai pemanasan selama 60 menit aktivitas residunya masih diatas 30%.

Polag grafik stabilitas pH terhadap aktivitas enzim *crude* dengan pengendapan amonium sulfat 60% lebih stabil dibandingkan dengan enzim murni karena adanya amonium sulfat mempertahankan stabilitas enzim dengan cara meningkatkan kekuatan ion larutan. Seperti pada Gambar 9.



Gambar 9. Pengaruh pH terhadap stabilitas enzim kolagenase *Bacillus* sp. KUB BPPT CC (A) enzim crude dan (B) enzim murni

4. KESIMPULAN

1. Ekstraksi kolagen yang diperoleh dengan menggunakan metode Nagai dan Suzuki yang telah dimodifikasi dilakukan uji dengan nilai rendemen kolagen 9.475, Nilai pH 6.8, Kadar air 5%, Kadar abu 0.6%, Kadar protein 0.425 mg/ml dan berat molekul adalah 130 kDa
2. Aktivitas enzim kolagenase tertinggi pada jam ke 36 yaitu 0.1001 U/ml

3. Pemurnian Enzim Kolagenase

- a. Pengendapan amonium sulfat 60% diperoleh tingkat kemurnian 2.43 kali dibandingkan enzim *crude*
 - b. Pemurnian dengan kolom DEAE Sephadex A-50 memberikan tingkat kemurnian 11.21 kali dibandingkan dengan enzim *crude*
 - c. Berat moleku enzim kolagense murni adalah 42 kDa
4. Hasil karakterisasi enzim *crude* dan enzim murni
 - a. Suhu optimum enzim *crude* dan enzim murni sama yaitu 50°C
 - b. pH optimum enzim *crude* adalah 10, sedangkan pH enzim murni adalah 7
 - c. Kestabilan pada suhu optimum menunjukkan enzim *crude* lebih stabil
 - d. Kestabilan pada pH optimum menunjukkan enzim *crude* lebih stabil

REFERENSI

- Baekhaki, A., 2012. *Kolagenase Bacillus licheniformis F11 asal Palembang dan aplikasinya pada pembuatan peptida kolagen bioaktif*, Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Bergmeyer, H. U., Bergmeyer, J. & Grassl, M., 1983. *Methods of Enzymatic Analysis*. 3rd ed. Weinheim: Verlag Chemie.
- Beynon, R. J. & Bond, J. S., 2000. *Proteolytic Enzymes: A Practical Approach*. s.l.:Oxford University Press.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *ELSEVIER*, 72(1-2), pp. 248-254.
- Kasim, S., 2013. Pengaruh Variasi Jenis Pelarut Asam Ekstraksi Kolagen dari Ikan Pari (*Himantura gerrardi*) dan Ikan Tuna (*Thunnus sp.*). *Majalah Farmasi dan Farmakologi*, 12(2).
- Miwada, I. S. & Simpen, I., 2007. Optimalisasi Potensi Ceker Ayam (Shank) Hasil Limbah Rpa Melalui Metode Ekstraksi Termomodifikasi Untuk Menghasilkan Gelatin. *Majalah Ilmiah Peternakan*.
- Nagai, T. & Suzuki, N., 2000. Isolation of collagen from fish waste material - Skin, bone and fins. *ELSEVIER*, 3(68), pp. 277-281.
- Nurhayati, T., Salamah, E., Irfan, M. & Nugraha, R., 2010. Aktivitas Enzim Katepsin dan Kolagenase pada Kulit Ikan Bandeng. *Jurnal Sumberdaya*

Rahmiati, R., 2004. Identifikasi dan isolasi kolagenase dari *Vibrio* sp B-30 yang ditumbuhkan dengan media TSB-YE-Salt. *Jurnal Widya Agrika*..

Scopes, R. K., 1987. *Protein Purification and Practice*. 2nd ed. New York: Springer Verlag.