

JURNAL PENGOLAHAN HASIL PERIKANAN INDONESIA

Mutu Sosis Fermentasi Ikan Patin (<i>Pangasius</i> sp.) Selama Penyimpanan Suhu Ruang	Rita Marsuci Harmain, Linawati Hardjito, Winarti Zahiruddin	80-93
Aktivitas Penghambatan Isolat Bakteri Asam Laktat dari Ikan Nila dan Tongkol terhadap Bakteri Merugikan Produk Perikanan	Rinto, Ade Dwi Sasanti, Kusumawati Fitria	94-100
Kandungan Gizi Keong Ipong-Ipong (<i>Fasciolaria salmo</i>) Akibat Metode Pengolahan	Sri Purwaningsih, Ella Salamah, Tiza Yunisca Sari	101-109
Recovery Enzim Protease dari Jeroan Ikan Tuna dengan Teknologi Ultrafiltrasi dan Reverse Osmosis	Bambang Riyanto, Uju, Sofia Halimi	110-118
Efektivitas Kitosan Mikrokristalin sebagai Alternatif Antibakteri Alami dalam <i>Mouthwash</i>	Bustami Ibrahim, Pipih Suptijah, Ahmad Zahid	119-126
Isolasi dan Identifikasi Awal Senyawa Inhibitor RNA Helikase Virus Hepatitis C dari Ekstrak Buah Mangrove <i>Avicennia marina</i> (Forsk.) Vierh	A. Zaenal Mustopa, Melki, Ika Sari Kusumawati	127-135
Aktivitas Biologis Tepung Biji Teratai Pra-Masak sebagai Produk Pangan Pencegah Diare	Yuspihana F, Rita Khairina, Ika K. Oktaviyanti	136-147
Toksitasitas Akut Ekstrak Metanol Rumput Laut Cokelat <i>Sargassum echinocarpum</i>	Muhamad Firdaus, Made Astawan, Deddy Muchtadi, Tutik Wresdiyati, Sarwono Waspadji, Setyawati S. Karyono	148-155
Karakteristik Protein dan Asam Amino Daging Rajungan (<i>Portunus pelagicus</i>) Akibat Pengukusan	Agoes M Jacob, Nurjanah, Lenni Asnita Br Lingga	156-163
Purifikasi Parsial dan Karakterisasi Enzim Katepsin dari Ikan Bandeng (<i>Chanos Chanos</i> Forskall)	Tati Nurhayati, Ella Salamah, Nico Dyannar	164-172



JURNAL PENGOLAHAN HASIL PERIKANAN INDONESIA

Ketua Redaksi : Kustiariyah Tarman

Dewan Redaksi : Nurjanah
Tati Nurhayati
Sugeng Heri Suseno
Linawati Hardjito
Amir Husni
Hari Eko Irianto

Penyunting Pelaksana : Roni Nugraha

**Administrasi dan
kesekretariatan** : Husnul Fitriah

Sirkulasi : Rully Firmansyah

Alamat Redaksi:

Departemen Teknologi Hasil Perairan, FPIK
Jl. Lingkar Akademik Kampus IPB
Dramaga Bogor 16680
Telp. (0251) 8622915 Fax. (0251) 8622916
E-mail: jurnalpengolahan@yahoo.com

Dipublikasikan oleh Masyarakat Pengolahan
Hasil Perikanan Indonesia (MPHPI)

Terbit 3 (tiga) kali dalam setahun

Editorial

Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia (JPPI) merupakan salah satu media yang ditujukan untuk memfasilitasi penyebaran perkembangan ilmu dan teknologi di bidang pengolahan dan bioteknologi hasil perikanan dan kelautan. Cakupannya meliputi komoditi ikan dalam arti yang luas sesuai Undang-undang Perikanan No. 31 tahun 2004, yaitu "segala jenis organisme yang seluruh atau sebagian dari siklus hidupnya berada di dalam lingkungan perairan", sehingga komoditi yang digarap meliputi flora dan fauna air.

Pada edisi ini tercermin dengan jelas dari topik yang diangkat antara lain adalah flora (rumput laut, mangrove dan teratai), sedangkan fauna terdiri atas finfish (ikan patin, nila, tongkol, tuna dan bandeng) dan shellfish (rajungan dan keong ipong-ipong).

Pertemuan ilmiah tahunan Masyarakat Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia (MPHPI) ke-4 dalam bentuk seminar nasional akan diselenggarakan di Universitas Brawijaya Malang pada tanggal 9-10 November 2012. Penyelenggara seminar kali ini adalah MPHPI Komisariat Jawa Bagian Timur.

KEPENGURUSAN

MASYARAKAT PENGOLAHAN HASIL PERIKANAN INDONESIA (MPHPI)

2009-2013

Pelindung : Menteri Kelautan dan Perikanan Indonesia
Pembina : Dirjen P2HP, Es-I Mendiknas, Es-I Menperindag
Pengaroh : Dir. Usaha & Investasi, Dir. PH, Ditjen P2HP
Sekretaris Pengarah: Prof. Hari Eko Irianto
Ketua Umum: Prof. Hari Eko Irianto
Ketua I: Prof. Dr. Sukoso
Ketua II: Ir. Adi Surya
Sekretaris I: Dr. Joko Santoso
Sekretaris II: Drs. Made W. Arthajaya, MSi
Bendahara I: Dr. Ir. Nurjanah, MS
Bendahara II: Dewi Mufita
Departemen Industri: Dr. Bustami, Ir. Nur Retnowati, Ir. M. Najib
Dept. Pendidikan: Dr. Eddy Afrianto, Dr. Amir Husni,
Dr. Tri Winarni Agustini, Ir. Wini Trilaksana, MSc
Dept. Litbang: Dr. Singgih W, MS, Dr. Hartati K, Fatur R, Dr. Aef P
Dept. Pengembangan Bisnis: Dr. Linawati Hardjito, Dr. Welizar,
Ir. Jamal Basmal, MSc, Yudi, Ir. Iwan Sutanto
Sekretariat: Agus Triyanto, Nova Riana B, Dinardani Ratrisari,
Reni Pratiwi, Desniar, MSi, Dr. Agoes MJ, Dwiwitno, K. Winta
Komisariat Sumatera: Rinto, SPi, MP
Kom Jawa Bag Barat (Jabar, DKI, Banten): Ir. Evi Liviawaty, MS
Kom Jawa Bag Tengah (Jateng & DIY): Dr. Latif Sahubawa
Kom Jawa Bag Timur (Jatim & Bali): Dr. Hepy Nur Syam
Kom Kalimantan: Dr. Yuspihana Fitriah
Kom Sulawesi: Dr. Metu Salach, MSc
Kom Maluku & Papua: Dr. Petrus Wennu

PURIFIKASI PARSIAL DAN KARAKTERISASI ENZIM KATEPSIN DARI IKAN BANDENG (*Chanos Chanos Forskall*)

*Partial Purification and Characterization of Cathepsin From Milkfish (*Chanos chanos Forskall*)*

Tati Nurhayati*, Ella Salamah, Nico Dynnar

Teknologi Hasil Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan,
Institut Pertanian Bogor

Diterima 30 Mei 2012/Disetujui 11 Oktober 2012

Abstract

Decomposition of protein in the enzymatic process will lead to changes in odor, texture, and appearance of fish. The enzymes that play a role in the enzymatic process is primarily proteolytic enzymes. Cathepsin enzyme is one of the proteolytic enzymes found in animal tissue that hydrolyzes peptide bonds of proteins. Information on optimal conditions of cathepsin enzyme activity is useful in the process of good handling, to avoid environmental conditions that can increase cathepsin enzymes activity, especially in milkfish. The purposes of this study were to partial purify the catepsin enzyme of milkfish and characterize the enzymes. Crude extract of enzyme had specific activity 0.8598 U/mg and after presipitation with ammonium sulphate 70% obtained specific activity of 4.4643 U/mg and after 6 hours of dialysis obtained specific activity 14.4404 U/mg. The enzyme cathepsin worked optimally at 40 °C and pH 4, and 3% substrate. Divalent metal ions inhibited the activity of the enzyme, higher compared to monovalent or trivalent metals. Cathepsin enzyme identified had molecular weight of 86.67 kDa.

Key words: cathepsin, characterization, milkfish, purification

Abstrak

Penguraian protein dalam proses enzimatik akan menyebabkan perubahan bau, tekstur, dan penampakan ikan. Enzim yang berperan dalam proses enzimatik terutama adalah enzim proteolitik. Enzim katepsin merupakan salah satu enzim proteolitik yang ditemukan pada jaringan hewan yang dapat menghidrolisis ikatan peptida pada protein. Informasi mengenai kondisi optimal enzim katepsin bekerja berguna dalam proses penanganan yang tepat sehingga pada proses penanganan dapat dihindari kondisi-kondisi lingkungan yang dapat meningkatkan kerja enzim katepsin secara optimal khususnya pada ikan bandeng. Tujuan penelitian ini ialah memurnikan secara parsial enzim katepsin dari ikan bandeng serta mengkarakterisasi enzim katepsin yang dihasilkan. Ekstraksi kasar diperoleh aktivitas spesifik 0,8598 U/mg dan setelah dipresipitasi dengan konsentrasi 70% amonium sulfat diperoleh aktivitas spesifik 4,4643 U/mg dan setelah 6 jam dialisis diperoleh aktivitas spesifik sebesar 14,4404 U/mg. Karakteristik enzim katepsin yang dihasilkan memiliki suhu dan pH optimum 40 °C dan 4, konsentrasi substrat 3%, sedangkan kehadiran ion logam menghambat aktivitas enzim. Ion logam divalen menghambat kerja enzim tertinggi, bila dibandingkan dengan logam monovalen atau trivalen. Enzim katepsin teridentifikasi memiliki bobot molekul 86,67 kDa.

Kata kunci: Ikan bandeng, karakterisasi, katepsin, pemurnian

PENDAHULUAN

Proses penurunan mutu ikan segar terutama diawali dengan proses perombakan oleh aktivitas enzim yang secara alami terdapat di dalam ikan. Salah satu jenis

enzim yang berperan penting dalam proses kemunduran mutu ikan adalah enzim-enzim pengurai protein (enzim proteolitik) yang menguraikan protein menjadi pepton, peptida dan asam-asam amino. Hidrolisis protein oleh suatu protease, yaitu katepsin, calpain dan kolagenase dapat menyebabkan timbulnya akumulasi metabolit, perubahan citarasa, dan

*Korespondensi: Jln. Lingkar Akademik, Kampus IPB Dramaga Bogor 16680. Telp. +622518622915 e-mail: nurhayati7870@yahoo.com

pelunakan tekstur, terbentuknya komponen volatil serta peningkatan jumlah bakteri yang akhirnya menimbulkan kebusukan

Aktivitas proteolitik menyebabkan perubahan fungsional dan sifat organoleptik dari daging ikan. Katepsin ditemukan di lisosom serat daging dan di sel fagosit. Lisosom merupakan intraseluler organel yang banyak mengandung enzim hidrolitik dan berperan dalam pencernaan dalam sel. Katepsin merupakan kelompok dari sistein protease diantaranya katepsin B (EC 3.4.22.2) dan L (EC 3.4.22.15) yang dapat menyebabkan terjadinya pelunakan daging (*softening*) pada ikan (Ladrat *et al.* 2006). Katepsin L ditemukan pada sebagian besar proteinase termasuk penyebab degradasi protein miofibril pada surimi ikan *Merluccius productus* (Morrissey *et al.* 1995).

Aktivitas katepsin berbeda-beda tiap fraksi daging dan spesies ikan. Aktivitas optimum dilaporkan pada suhu 40-50 °C dan aktivitasnya menurun dengan penurunan suhu. Enzim katepsin secara umum bekerja pada pH 3-4 dan beberapa katepsin juga mempunyai aktivitas tinggi pada pH 6-6,5 (Aoki *et al.* 2000; Kolodziejska dan Sikorski 1996).

Informasi mengenai kondisi optimal enzim katepsin bekerja berguna dalam proses penanganan yang tepat sehingga pada proses penanganan dapat dihindari kondisi-kondisi lingkungan yang dapat meningkatkan kerja enzim katepsin secara optimal khususnya pada ikan bandeng. Tujuan penelitian ini adalah mengekstrak dan mengkarakterisasi enzim katepsin pada ikan bandeng.

MATERIAL DAN METODE

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri atas bahan utama yakni ikan bandeng dalam keadaan post-rigor, bahan-bahan untuk ekstraksi kasar (buffer Tris HCl 0,1 M pH 7,4, akuades), presipitasi (amonium sulfat teknis), dialisis (kantong dialisis, bufer Tris HCl pH 7,4), uji aktivitas katepsin (hemoglobin (Sigma), buffer Tris 0,1 pH 7,4,

tirosin (Appllichem), akuades, TCA (Merck) 5%, folin (Merck), HCl 1 N), dan uji kadar protein (pereaksi Bradford, bovine serum albumin (Appllichem)).

Alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain inkubator (Thermoline), sentrifuse suhu dingin (Himac), spektrofotometer (Yamato), pH meter, tabung dialisis, kertas saring Whatman No.1 dan labu Erlenmeyer.

Metode Penelitian

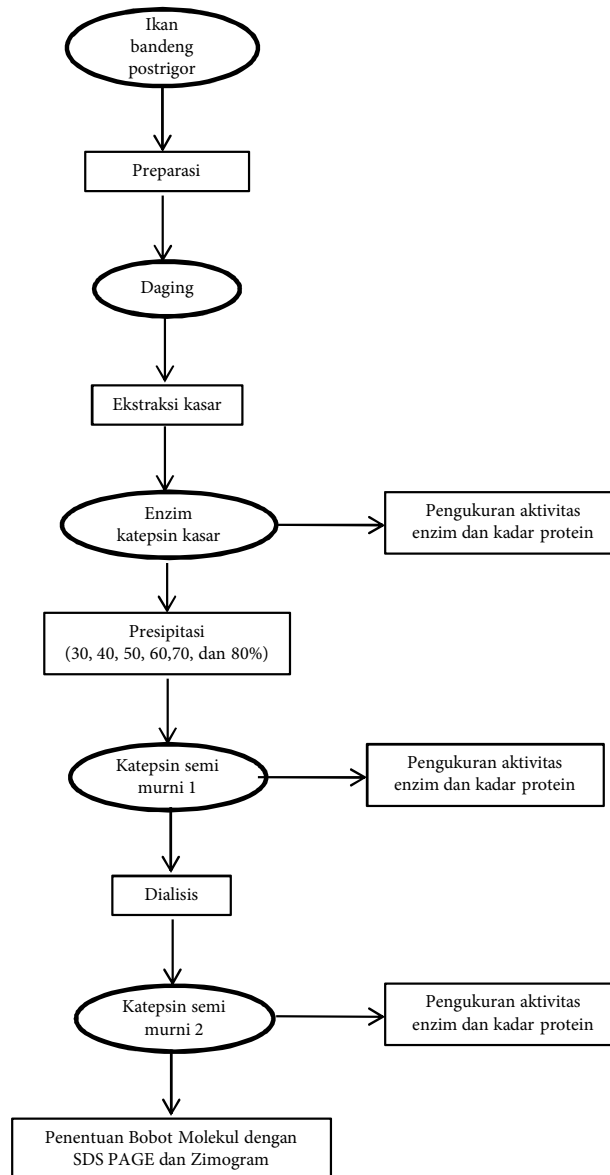
Penelitian ini dilakukan melalui dua bagian, yaitu (1) pemurnian parsial enzim katepsin yang terdiri atas ekstraksi enzim katepsin kasar, presipitasi dan dialisis, (2) karakterisasi enzim katepsin hasil dialisis yang memiliki aktivitas spesifik tertinggi meliputi pH, suhu, konsentrasi substrat, pengaruh ion logam, serta penentuan bobot molekul. Pengujian aktivitas enzim katepsin mengacu pada metode Dinu *et al.* (2002), uji kadar protein mengacu pada Bradford (1976), dan SDS-PAGE serta zimogram mengacu pada Laemmli (1970). Diagram alir penelitian disajikan pada Gambar 1.

Pemurnian parsial enzim katepsin

Ekstraksi enzim katepsin (Dinu *et al.* 2002)

Ekstraksi dilakukan dengan preparasi sampel untuk memperoleh ekstrak kasar protease katepsin. Proses ekstraksi menggunakan ikan bandeng yang sudah post-rigor. Daging ikan diambil dan disuspensikan dalam akuades dengan perbandingan daging ikan dan akuades sebesar 1:1, lalu dihomogenisasi pada suhu 0-4 °C.

Ekstrak daging hasil homogenisasi disentrifugasi pada 600 x g selama 10 menit dan supernatan yang diperoleh kemudian disentrifugasi lagi pada 10.000xg selama 10 menit. Pelet yang dihasilkan dari hasil sentrifugasi kemudian dilarutkan dalam 0,1 M bufer Tris HCl pH 7,4 dengan jumlah yang sama seperti jumlah akuades tadi dan disentrifugasi pada 4.000xg selama 10 menit. Hasil supernatan (ekstrak kasar protease katepsin) yang diperoleh merupakan protein



Gambar 1 Diagram alir penelitian.

utama dari mitokondria dan lisosom yang siap untuk diteliti aktivitasnya lebih lanjut. Analisis yang dilakukan meliputi aktivitas enzim katepsin (Dinu *et al.* 2002), konsentrasi protein (Bradford 1976), dan aktivitas spesifik enzim. Aktivitas spesifik enzim (U/mg) dihitung dengan membagi aktivitas enzim (U/mL) dengan konsentrasi protein (mg/mL).

Presipitasi dan dialisis

Katepsin semi murni diperoleh dengan mengendapkan ekstrak kasar katepsin

menggunakan ammonium sulfat dengan tingkat kejenuhan 30%, 40%, 50%, 60%, 70% dan 80% (b/v). Pengendapan dilakukan dengan menambahkan garam amonium sulfat ke dalam supernatan sedikit demi sedikit dan disentrifugasi pada 12000xg selama 30 menit.

Pelet dilarutkan dalam bufer Tris HCl 0,1 M pH 7,4. Langkah selanjutnya yakni dialisis. Dialisis dilakukan dalam bufer Tris HCl pH 7,4 menggunakan kantong selofan berukuran 12 kDa, dengan waktu dialisis 2, 4, 6, dan 8 jam. Tahap presipitasi dan dialisis ini

dilakukan pada suhu ≤ 4 °C. Pengujian yang dilakukan pada tahap ini meliputi aktivitas enzim katepsin (Dinu *et al.* 2002), pengukuran konsentrasi protein (Bradford 1976), dan aktivitas spesifik enzim. Aktivitas spesifik enzim (U/mg) dihitung dengan membagi aktivitas enzim (U/mL) dengan konsentrasi protein (mg/mL).

Karakterisasi enzim katepsin

Karakterisasi dilakukan terhadap hasil dialisis dengan aktivitas spesifik yang tertinggi. Karakterisasi meliputi penentuan suhu optimum (20, 30, 40, 50, 60 dan 70 °C), pH optimum (2, 3, 4, 5, 6, dan 7) dengan bufer Tris HCl, pengaruh ion logam (NaCl, BaCl₂, CaCl₂, AlCl₃ dan FeCl₃) dengan konsentrasi logam masing-masing 5 mM dan penentuan konsentrasi substrat optimum (0,5-4,5% dengan selang 0,5% b/v).

HASIL DAN PEMBAHASAN

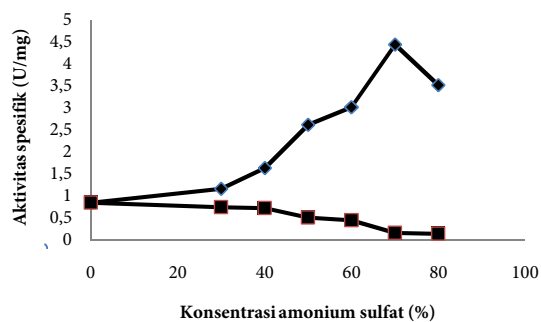
Pemurnian Parsial Enzim Katepsin

Ekstrak kasar

Pemurnian enzim katepsin diawali dengan ekstraksi kasar dari daging ikan bandeng yang sudah memasuki tahap postregor. Ekstrak kasar yang dihasilkan memiliki aktivitas spesifik sebesar 0,86 U/mg. Penelitian Toyohara *et al.* (2006) menyebutkan bahwa ekstrak kasar katepsin A yang berasal dari daging ikan mas memiliki aktivitas spesifik sebesar 0,279 U/mg. Ini berarti bahwa aktivitas ekstrak kasar enzim katepsin yang dihasilkan dari ikan bandeng lebih tinggi dibandingkan dengan yang diekstrak dari daging ikan mas.

Presipitasi

Ekstrak kasar yang diperoleh dipresipitasi menggunakan amonium sulfat. Aktivitas spesifik pelet pada beberapa tingkat konsentrasi amonium sulfat mengalami peningkatan dan mencapai aktivitas optimum pada perlakuan konsentrasi amonium sulfat 70% (Gambar 2), sementara aktivitas spesifik pada supernatan menunjukkan penurunan



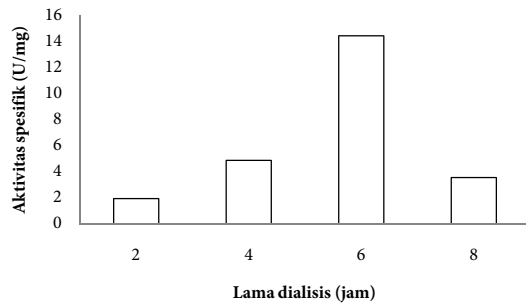
Gambar 2 Aktivitas spesifik katepsin setelah pengendapan dengan amonium sulfat ◆ aktivitas spesifik pelet, ■ aktivitas spesifik supernatan

aktivitas spesifik.

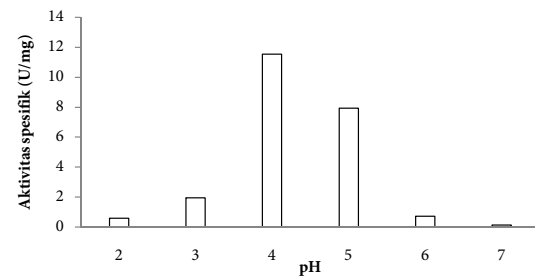
Aktivitas spesifik pelet pada beberapa tingkat konsentrasi amonium sulfat mengalami peningkatan dan mencapai aktivitas optimum pada perlakuan konsentrasi amonium sulfat 70% (Gambar 2), sedangkan aktivitas spesifik pada supernatan menunjukkan penurunan. Penurunan kadar protein dalam supernatan terjadi selama proses presipitasi, namun terjadi peningkatan konsentrasi dalam pelet. Kondisi ekstraksi yang optimum ditunjukkan oleh aktivitas yang paling tinggi dalam endapan.

Enzim yang dihasilkan dari presipitasi 70% memiliki aktivitas spesifik sebesar 4,46 U/mg. Penelitian Toyoharay *et al.* (2006) menyebutkan bahwa katepsin A yang berasal dari daging ikan mas pada hasil pengendapan amonium sulfat didapatkan aktivitas spesifik sebesar 3,43 U/mg, sementara penelitian Baehaki *et al.* (2004) terhadap aktivitas spesifik protease lain yang didapatkan dari bakteri *Aeromonas hydrophila* menunjukkan aktivitas spesifik tertinggi pada pengendapan amonium sulfat 70% sebesar 2,07 U/mg. Ini berarti bahwa aktivitas enzim katepsin dari ikan bandeng hasil pengendapan amonium sulfat lebih tinggi dibandingkan yang berasal dari daging ikan mas dan bakteri *A. hydrophila*.

Kelarutan protein (pada pH dan temperatur tertentu) akan meningkat sejalan dengan peningkatan konsentrasi garam (*salting in*). Peningkatan kelarutan protein akan meningkatkan kekuatan ion larutan. Penambahan garam dengan konsentrasi



Gambar 3 Aktivitas spesifik enzim setelah didialisis



Gambar 4 Pengaruh pH terhadap aktivitas spesifik katepsin menggunakan bufer Tris HCl.

tertentu akan menyebabkan kelarutan protein menurun (*salting out*). Molekul air yang berikatan dengan ion-ion garam semakin banyak yang menyebabkan penarikan selubung air yang mengelilingi permukaan protein sehingga mengakibatkan protein saling berinteraksi, beragregasi, dan kemudian mengendap (Grogan 2009).

Dialisis

Aktivitas spesifik pada pelet yang didialisis mengalami peningkatan sampai titik optimum yaitu 6 jam (Gambar 3). Enzim yang dihasilkan dari tahap dialisis memiliki aktivitas spesifik sebesar 14,44 U/mg. Prinsip dari dialisis ialah aplikasi preparasi enzim ke dalam kantong dialisis yang terbuat dari membran semi-permeabel yang memungkinkan molekul berukuran kecil untuk bermigrasi (Grogan 2009).

Pemurnian parsial hingga tahap dialisis mampu meningkatkan kelipatan pemurnian sebesar 16,8 kali. Rendemen yang dihasilkan pada tahap ini sebesar 24%. Kelipatan pemurnian pada setiap tahap disajikan pada Tabel 1.

Karakterisasi Katepsin

Karakterisasi dilakukan untuk melihat seberapa besar pengaruh kondisi lingkungan

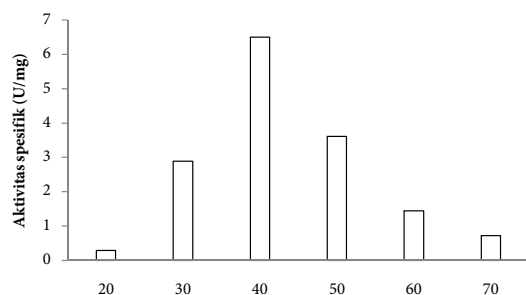
terhadap aktivitas enzim dan mengetahui kondisi optimum lingkungan untuk mendapatkan enzim dengan aktivitas yang tinggi. Karakterisasi yang dilakukan pada enzim katepsin berupa konsentrasi substrat, tingkat keasaman (pH), suhu, dan pengaruh logam.

Tingkat keasaman (pH)

Enzim katepsin memiliki aktivitas spesifik optimum pada pH 4 sebesar 11,5523 U/mg (Gambar 4), hal ini sesuai dengan pendapat Aoki *et al.* (2000) bahwa enzim katepsin aktif pada pH asam, sementara penelitian yang dilakukan Toyohara *et al.* (2006) pada daging ikan mas, katepsin A memiliki pH optimum 5. Penelitian yang dilakukan oleh Balti *et al.* (2010) terhadap katepsin D yang berasal dari hepatopankreas sotong memiliki aktivitas spesifik optimum pada pH 3. Penelitian yang dilakukan oleh Krause *et al.* (2010) terhadap enzim katepsin D yang berasal dari daging burung unta (*Musculus iliofibularis*) menyebutkan katepsin D memiliki aktivitas optimal pada pH 4. Penelitian lain yang dilakukan oleh Jiang *et al.* (2002) terhadap katepsin D ikan tongkol dan ikan bandeng, menyatakan katepsin D memiliki aktivitas

Tabel 1 Peningkatan aktivitas katepsin pada berbagai tahap pemurnian

Tahapan	Total protein (mg)	Total aktivitas (U)	Aktivitas spesifik (U/mg)	Yield (%)	Kelipatan pemurnian
Ektrak kasar	58,15	50	0,86	100	1,00
Presipitasi	2,02	9	4,46	18	5,20
Dialisis	0,83	12	14,44	24	16,80



Gambar 5 Pengaruh suhu terhadap aktivitas spesifik katepsin.

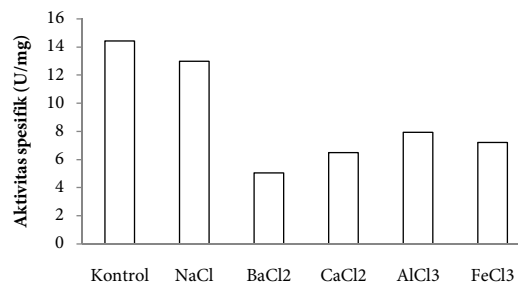
tertinggi pada pH 5,04 (ikan tongkol) dan pH 4,91 (ikan bandeng).

Pengikatan antara enzim dengan substrat dan reaksi katalisisnya bergantung pada interaksi antara substrat dengan rantai samping asam amino yang menyusun sisi aktif enzim. Peristiwa ini harus berada pada keadaan ionisasi yang tepat untuk mengikat, dan hal ini tergantung pada pH medium (Jiang *et al.* 2002). Gugus ionik berperan dalam menjaga konformasi sisi aktif dalam mengikat substrat dan dalam mengubah substrat menjadi produk (Baehaki *et al.* 2005).

Suhu

Kenaikan suhu meningkatkan aktivitas spesifik enzim katepsin sampai pada titik tertentu, sementara peningkatan suhu lebih lanjut membuat aktivitas spesifik enzim menurun. Enzim katepsin pada penelitian ini memiliki aktivitas spesifik optimum pada suhu 40 °C dengan nilai aktivitas sebesar 6,4982 U/mg (Gambar 5).

Penelitian yang dilakukan oleh Balti *et al.* (2010) terhadap katepsin D yang berasal dari hepatopankreas sotong memiliki aktivitas spesifik optimum pada suhu 50 °C. Penelitian yang dilakukan oleh Krause *et al.* (2010) terhadap enzim katepsin D yang berasal dari daging burung unta menyebutkan katepsin D memiliki aktivitas optimum pada suhu 45 °C. Penelitian lain yang dilakukan oleh Jiang *et al.* (2002) terhadap katepsin D ikan tongkol dan ikan bandeng, menyatakan enzim katepsin pada ikan tongkol memiliki aktivitas tertinggi pada suhu 45 °C dan ikan bandeng pada suhu 50 °C.



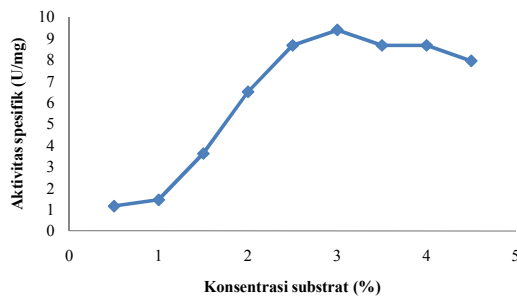
Gambar 6 Pengaruh logam terhadap aktivitas spesifik pada konsentrasi logam 5 mM.

Tingkat enzim mengkatalisis reaksi akan meningkat sejalan dengan peningkatan suhu (Polgar 1990). Suhu yang lebih tinggi akan membuat molekul-molekul lebih sering bertabrakan. Konsep ini berlaku juga untuk tumbukan antar molekul substrat dengan enzim, hal ini disebabkan suhu yang tinggi akan mengkatalisis reaksi enzimatik, namun ketika kenaikan suhu melebihi titik tertentu akan menyebabkan gangguan terhadap struktur tersier enzim (Aledo dan Riveres 2008). Perubahan struktur tersier pada sisi aktif akan menghambat aktivitas katalitik enzim (Liu *et al.* 2008).

Pengaruh logam

Keberadaan logam sangat berpengaruh terhadap aktivitas spesifik enzim. Keberadaan logam pada enzim akan menghambat kerja enzim, sehingga aktivitas spesifik enzim akan lebih kecil jika dibandingkan dengan enzim tanpa adanya logam. Ion logam divalen (BaCl_2 dan CaCl_2) menghambat kerja enzim lebih tinggi, dibandingkan dengan logam monovalen (KCl) maupun trivalen (AlCl_3 dan FeCl_3) (Gambar 6).

Penelitian yang dilakukan oleh Balti *et al.* (2010) terhadap katepsin D yang berasal dari hepatopankreas sotong, menyebutkan aktivitas enzim katepsin D akan meningkat oleh keberadaan ion logam Mg^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Sr^{2+} , and Co^{2+} , sementara keberadaan ion logam Na^+ , K^+ , dan Ca^{2+} tidak berpengaruh terhadap aktivitas enzim katepsin D. Penelitian lain yang dilakukan oleh Jiang *et al.* (2002) terhadap katepsin D



Gambar 7 Pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas spesifik katepsin.

ikan tongkol dan ikan bandeng, menyatakan keberadaan ion logam Na^+ dan K^+ akan meningkatkan aktivitas katepsin D, sementara ion logam Mg^{2+} , Sr^{2+} , Fe^{2+} , dan Hg^{2+} akan menghambat aktivitas katepsin D.

Kerja enzim dapat dihambat oleh zat penghambat atau inhibitor. Inhibitor non kompetitif tidak bersaing dengan substrat untuk berikatan dengan enzim. Inhibitor jenis ini akan berikatan dengan enzim pada sisi yang berbeda (bukan sisi aktif). Sisi aktif enzim akan berubah jika telah terjadi ikatan enzim-inhibitor, sehingga substrat tidak dapat berikatan dengan enzim. Banyak ion logam bekerja sebagai inhibitor non-kompetitif (Grogan 2009).

Konsentrasi substrat

Konsentrasi substrat merupakan salah satu faktor yang berpengaruh terhadap jumlah produk yang dihasilkan. Substrat dibutuhkan

oleh enzim untuk berikatan dengan sisi aktif enzim sehingga akan terbentuk produk.

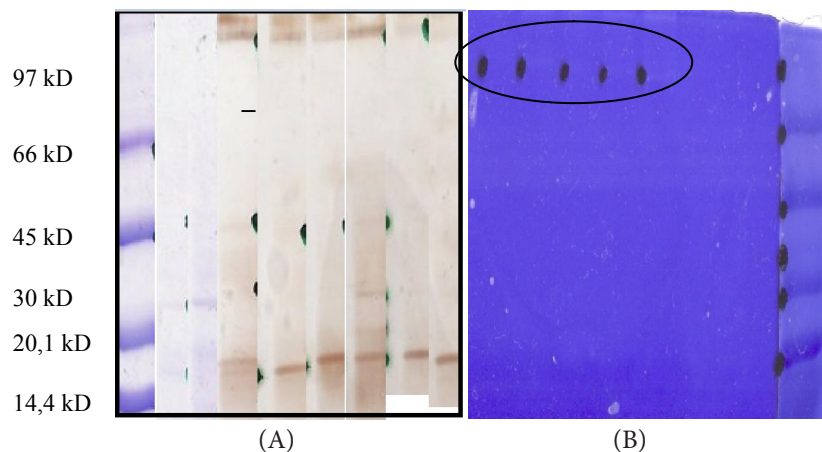
Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi substrat memberikan pengaruh terhadap aktivitas spesifik enzim yang dihasilkan. Semakin meningkatnya konsentrasi substrat, maka aktivitas spesifik cenderung meningkat sampai titik tertentu.

Konsentrasi substrat sebesar 3% merupakan konsentrasi substrat optimum untuk enzim katepsin dengan nilai aktivitas spesifik sebesar 9,3863 U/mg (Gambar 7). Semakin banyak molekul substrat yang tersedia, semakin sering molekul-molekul tersebut memasuki sisi aktif molekul enzim.

Konsentrasi substrat itu akan menjadi cukup tinggi pada suatu titik tertentu sehingga semua sisi aktif pada semua molekul enzim sudah ditempati oleh substrat, segera setelah produk meninggalkan sisi aktif, molekul substrat yang lain akan masuk. Pada konsentrasi substrat seperti ini, enzim dikatakan mengalami kejenuhan, dan laju reaksi ditentukan oleh kecepatan sisi aktif mengubah substrat menjadi produk. Satu-satunya cara untuk meningkatkan produktivitas ketika suatu enzim telah jenuh ialah menambahkan lebih banyak lagi enzim (Champbell *et al.* 2002).

Bobot molekul

Penentuan bobot molekul dilakukan menggunakan SDS-PAGE dan zimogram.



Gambar 8 Penentuan bobot molekul enzim katepsin dengan SDS PAGE (A) dan zimogram (B).

Hasil analisis menggunakan SDS-PAGE dan zimogram disajikan pada Gambar 8. Bobot molekul ditentukan berdasarkan kurva standar, pada SDS diketahui persamaannya $Y = -1,037x + 2,112$, sementara pada zimogram diketahui persamaannya $Y = -1,384x + 2,145$.

Enzim katepsin baru terlihat aktivitas katalitiknya pada tahap presipitasi dan dialisis, pada tahap ini enzim katepsin teridentifikasi memiliki bobot molekul 88,67 kDa. Hasil penelitian yang dilakukan oleh (Balti *et al.* 2010) terhadap katepsin D yang berasal dari hepatopankreas sotong (*Sepia officinalis*) terestimasi memiliki bobot molekul 37,5 kDa. Katepsin D yang berasal dari daging burung unta memiliki bobot molekul 29,1 kDa (Krause *et al.* 2010). Penelitian lain yang dilakukan oleh Jiang *et al.* (2002) terhadap katepsin D ikan tongkol dan ikan bandeng, menyatakan katepsin D pada ikan tongkol terestimasi sebesar 51 kDa dan pada ikan bandeng sebesar 54 kDa.

KESIMPULAN

Aktivitas spesifik optimum enzim katepsin diperoleh pada presipitasi menggunakan amonium sulfat 70% dan dialisis selama 6 jam. Kondisi optimum lingkungan untuk aktivitas enzim katepsin yang tinggi ialah suhu 40 °C, pH 4, dan konsentrasi substrat 3%. Ion logam divalen menghambat kerja enzim lebih tinggi dibandingkan dengan logam monovalen maupun trivalen. Enzim katepsin teridentifikasi memiliki bobot molekul sebesar 86,67 kDa.

DAFTAR PUSTAKA

- Aoki T, Yamashita T, Ryuji U. 2000. Distribution of cathepsins in red and white muscles among fish species. *Fisheries Science* 66(4): 776-782.
- Aledo JC, Riveres SJ. 2008. The effect of temperature on the enzyme catalyzed reaction: insights from thermodynamics. *Journal Chemical Education* 87(3): 296-298.
- Baehaki A, Nurhayati T, Suhartono MT. 2004. Karakterisasi protease bakteri *Aeromonas hydrophila*. *Buletin Teknologi Hasil Perikanan* 7(2): 60-71.
- Baehaki A, Nurhayati T, Suhartono MT. 2005. Karakterisasi protease dari bakteri pathogen *Staphylococcus epidermidis*. *Buletin Teknologi Hasil Perikanan* 8(2): 25-34.
- Balti F, Noomen H, Kemel J, Naima NA, Guillochon D, Moncef N. 2010. Cathepsin D from hepatopancreas of the cuttlefish (*Sepia officinalis*): purification and characterization. *Journal Agricultural Food Chemistry* 19:10623-10630.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 234-254.
- Champbell NA, Reece JB, Mitchell LG. 2002. *Biologi* Ed ke-5. Manalu W, penerjemah. Terjemahan dari Biology. Jakarta: Erlangga.
- Dinu D, Dumitru IF, Neichifor MT. 2002. Isolation and characterization of two chatepsin from muscle of *Carrassius auratus gibelio*. *Roumanian Biotechnological Letters* 7(3): 753-758.
- Grogan G. 2009. *Practical Biotransformation. Postgraduates Chemistry Series*. Chichester: John Willey & Sons Ltd.
- Jiang ST, Her YH, Lee JJ, Jeng HW. 2002. Comparison of the cathepsin D from mackerel (*Scomber australasicus*) and milkfish (*Chanos chanos*) muscle. *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry* 57(4): 571-577.
- Kolodziejska I, Sikorski ZE. 1996. Neutral and alkaline muscle proteases of marine fish and invertebrates - A review. *Journal of Food Biochemistry* 20: 349-363.
- Krause J, Shonisani CT, Tomohisa O, Yasuharu, Vaughan, Benesh S, Muramoto K, Ryno JN. 2010. Purification and partial characterization of ostrich skeletal muscle cathepsin D and its activity during meat maturation. *Journal Meat Science* 87(3): 196-201.

- Ladrat DC, Cheret R, Taylor R, Bagnis VV. 2006. Trends in postmortem aging in fish: understanding of proteolysis and disorganization of the myofibrillar structure. *Critical Review in Food Science and Nutrition* 46(5): 409-421
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the heat of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Liu H, Yin L, Li S, Zhang N, Ma C. 2008. Effects of endogenous cathepsin b and l on degradation of silver carp myofibrillar proteins. *Journal of Muscle Foods* 19(2): 125-139.
- Morrissey MT, Hartley PS, An H. 1995. Proteolysis in Pacific Whiting and Effect of Surimi Processing. *Journal of Aquatic Food Product Technology* 4(4): 5-18.
- Polgar L. 1990. *Mechanism of Protease Action*. Florida: CRC Press.
- Toyohara H, Makinodan Y, Ikeda S. 1981. Purification and properties of carp muscle cathepsin A. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 48(8): 1145-1150.