

SEMIPURIFIKASI DAN KARAKTERISASI KOLAGENASE DARI ORGAN DALAM IKAN BANDENG (*Channos channos*, Forskal) ¹

Oleh
Tatty Yuniarti², Tati Nurhayati³, Agoes M. Jacob³

Abstrak

Aktivitas enzim-enzim proteolisis seperti kolagenase, dapat memecah protein menjadi molekul yang lebih sederhana (autolisis) mengakibatkan terjadinya pelepasan daging ikan pada fase post mortem. Penelitian perlu dilakukan untuk mengetahui sifat-sifat enzim tersebut. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk memurnikan dan mengkarakterisasi enzim kolagenase dari organ dalam bandeng. Enzim kolagenase telah dapat dimurnikan dari organ dalam bandeng (*Chanos chanos*, Forskal), dengan ekstraksi dan pengendapan menggunakan ammonium sulfat. Tingkat kelipatan pemurnian yang dihasilkan 2,347 dan yield adalah 35,42. Karakterisasi kolagenase menunjukkan suhu optimum 50 °C dan pH optimum 8-9. Enzim kolagenase dapat dihambat dengan kuat oleh serine proteinase inhibitor (PMSF) dan meningkat aktivitasnya dengan penambahan Ca^{2+} dan Na^+ , enzim kolagenase ini stabil pada 10-50 °C and pH 8-9.

Kata kunci : kolagenase, karakterisasi, semipurifikasi, organ dalam bandeng.

¹ Tulisan ini adalah bagian dari tesis atas nama Tatty Yuniarti dari Mayor Teknologi Hasil Perairan, IPB

² Jurusan Penyuluhan Perikanan, STP

³ Departemen Teknologi Hasil Perairan, IPB

PENDAHULUAN

Ikan bandeng (*Chanos chanos*, Forskal) merupakan spesies penting dalam perikanan budidaya di Indonesia. Ikan bandeng menjadi salah satu produk yang mendominasi produksi perikanan budidaya yaitu sebesar 269.530 ton dari total produksi perikanan budidaya, yaitu sebesar 2.625.800 ton (Ditjen Perikanan Budidaya 2007). Kandungan gizi ikan bandeng dalam 85 g yaitu protein 17 g, lemak 5,7 g dan karbohidrat 0,0 g. Selain itu, ikan bandeng juga kaya akan mineral seperti Fe, Ca, P, Mg dan K, serta vitamin A dan B kompleks (USDA SR-21 2009).

Kandungan gizi ikan bandeng menjadi tidak bernilai tinggi apabila tidak ditangani dengan baik setelah penangkapan atau pemanenan. Hal ini disebabkan ikan bandeng sebagai bahan pangan ikani sangat rentan terhadap kerusakan (*highly perishable food*). Kerusakan ini dapat terjadi secara fisik, biokimiawi maupun mikrobiologi. Kerusakan daging ikan yang terjadi pada fase *rigor mortis* dan diakhiri pada fase *post rigor*, ditandai dengan meleemasnya daging ikan (*softening*). Pelelasan ini bukan disebabkan oleh terpecahnya protein aktomiosin yang telah

terbentuk tetapi karena kerusakan jaringan daging ikan. Kerusakan ini disebabkan oleh aktivitas enzim-enzim proteolisis yang memecah protein menjadi molekul yang lebih sederhana (autolisis) (Clucas dan Ward 1996).

Enzim-enzim proteolisis mampu menghidrolisis protein pada daging ikan. Enzim-enzim tersebut antara lain kolagenase, katepsin dan kalpain. Aktivitas kolagenase menyebabkan terjadinya keadaan yang tidak diinginkan, yaitu terpisahnya jaringan ikat daging ikan (*gaping*) (Hultman 2003). Hultman dan Rustrad (2004) menyatakan bahwa enzim endogeneous kolagenase mempengaruhi perubahan tekstur daging ikan (*fillet*) Atlantic salmon (*Salmo salar*) pada fase *post mortem*.

Aktivitas kolagenase tertinggi dari ikan bandeng terdapat pada fase pos rigor (Fentiana 2009). Ekstrak kasar kolagenase dari usus diketahui mengandung aktivitas kolagenase yang lebih tinggi, dibandingkan organ dalam yang lain (Yuniarti *et al.* 2010). Akan tetapi kolagenase yang lebih dimurnikan belum diketahui sifat karakteristiknya. Sifat-sifat kolagenase dari ikan bandeng penting diketahui agar dapat dihindari kondisi yang tidak

diinginkan. Kolagenase dari ikan bandeng dapat digunakan sebagai alternatif sumber enzim baru, sebab sumber-sumber enzim baru masih diperlukan (BPPT 2003). Kolagenase sebagai salah satu produk bioteknologi dapat dimanfaatkan dalam berbagai bidang. Kolagenase telah digunakan dalam perbaikan radang pada jaringan, transplantasi klinis, fungsi seluler dalam penggumpalan darah, fibrinolisis dan fertilisasi (Simpson 2000) dan mempercepat proses penyembuhan luka (Rilley dan Herman 2005). Kolagenase dari hepatopankreas kepiting telah digunakan untuk *deskinning* pada cumi-cumi (Lopez dan Carreno 2000).

Penelitian ini bertujuan untuk memurnikan kolagenase hingga tahap pemurnian yang biasa digunakan dalam industri yaitu pengendapan menggunakan ammonium sulfat dan melakukan karakterisasi kolagenase dari usus ikan bandeng. Penelitian ini bermanfaat untuk mendapatkan informasi sehingga dapat mengaplikasikan kolagenase sesuai dengan sifat dan karakterisasinya tersebut dan memanfaatkan organ dalam ikan bandeng sebagai alternatif sumber kolagenase.

METODOLOGI

Penelitian dilaksanakan pada Desember 2008 sampai dengan November 2009. Ikan bandeng diperoleh dari tambak di desa Dadap, Tangerang. Penelitian bertempat di Laboratorium Mikrobiologi dan Biokimia Hasil Perairan, Departemen THP; Laboratorium ProLink, MSP, FPIK; Laboratorium Penyakit Hewan, FKH; dan Laboratorium Bioteknologi, Pusat Penelitian Sumberdaya Hayati dan Bioteknologi, Lembaga Penelitian dan Pemberdayaan Masyarakat, IPB.

Tahap-tahap Penelitian

Semi purifikasi kolagenase dilakukan dalam tiga tahap, yaitu preparasi organ dalam, ekstraksi dan pengendapan. Karakterisasi kolagenase meliputi penentuan kondisi optimum enzim kolagenase. Ditentukan juga kestabilan kolagenase terhadap suhu dan pH.

Organ dalam bandeng dipisahkan bagian usus, lalu dicuci dengan aquades dingin dan dikemas dalam kantung plastik dan segera disimpan pada suhu -20 °C. Pemilihan ikan bandeng fase post rigor berdasarkan pengamatan secara visual organoleptis sesuai SNI 01 2729-2006. Organ dalam masing-masing ditambahkan

buffer Tris-HCl (Applicchem) pada pH 8,0 dan dihomogenisasi menggunakan homogenizer (Nissei AM-3). Homogenat disentrifugasi menggunakan sentrifuse dingin (Sorvall) dengan kecepatan 7000xg selama 20 menit pada suhu 4 °C. Supernatan ditambah 20 mM Tris-HCl pH 8,0. Ekstrak kolagenase kasar diendapkan menggunakan ammonium sulfat padat dengan tingkat kejenuhan yang bervariasi, yaitu antara 30%-80% (w/v).

Karakterisasi kolagenase meliputi penentuan suhu optimum 10-80 °C; pH optimum 4,0-10,0; pengaruh ion logam (NaCl, CaCl₂, BaCl₂, MnCl₂ dan CoCl₂) (Merck) masing masing dengan konsentrasi 1 dan 5 mM; dan inhibitor EDTA (Merck), PMSF, dan pepstatin. Analisis meliputi uji aktivitas kolagenase berdasarkan metoda spektrofotometri (Moore dan Stein 1954, diacu dalam Kim *et al.* 2002) dan analisis protein menggunakan metoda Bradford (Bradford 1967). Substrat kolagen terbuat dari kulit ikan bandeng. Satu unit aktivitas kolagenase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang menyebabkan perubahan 1 µmol substrat per menit pada pH 8,0 dan suhu 37 °C.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Aktivitas kolagenase pada usus adalah sebesar 0,141 Unit/ml. Konsentrasi protein kolagenase tersebut adalah 0,785 mg/ml, atau aktivitas spesifiknya sebesar 0,178 Unit/mg. Aktivitas spesifik kolagenase ini lebih rendah daripada ekstrak kasar kolagenase dari pilorik kaeka ikan tuna (*Thunnus thynnus*) (Byun *et al.* 2002) dan organ dalam filefish (*Novodon modestrus*) (Kim *et al.* 2002).

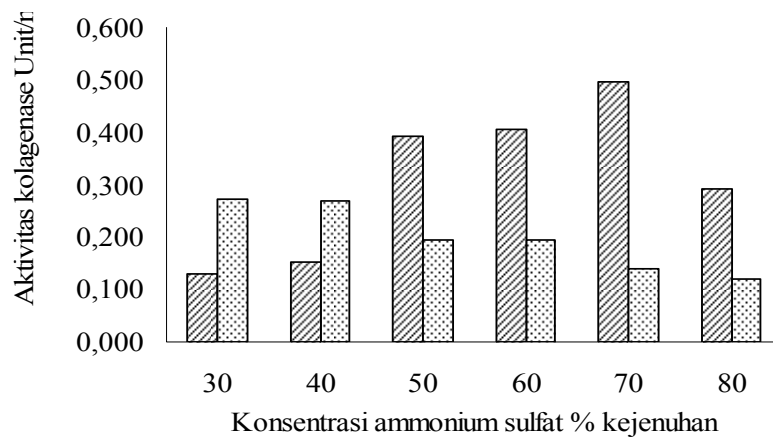
Kolagenase diproduksi oleh sel-sel jenis sel stromal, sel ephitel, makrofagus dan leukosit (Strenlicht & Werb 2001). Usus adalah organ pencernaan yang terbangun dari sel-sel epitelium. Khojasteh *et al.* (2009) melaporkan bahwa secara histologi, struktur dinding sel usus halus pada ikan *rainbow trout* (*Oncorhynchus mykiss*) hampir sama dengan hewan vertebrata lain. Usus halus merupakan tempat sebagian pencernaan secara kimiawi terjadi. Sebagian besar enzim pencernaan yang bekerja pada usus disekresikan oleh pankreas melalui pankreatik *duct*. Lapisan tipis jaringan penghubung bersifat asam memisahkan mukosa dan sub mukosa. Pada permukaan mukosa terdapat villi, mengurangi lebar bagian depan dan ujung

usus, dan epitelium yang membentuk lapisan tunggal kolom sel dengan basal nukleus yang mengandung nukleus, garis *apical brush* dan sitoplasma asidofilik. Kolagenase dari usus ini selanjutnya digunakan oleh organ-organ tertentu yang memerlukannya.

Penambahan ammonium sulfat pada ekstrak kasar menghasilkan endapan dan supernatan, yang masing-masing diuji aktivitas kolagenasinya. Hasil uji aktivitas terhadap hasil pengendapan diperoleh aktivitas tertinggi terdapat pada endapan dengan penambahan 70% (w/v) tingkat kejenuhan $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$, yaitu sebesar 0,496 Unit/ml dengan konsentrasi protein sebesar 1,185 mg/ml, dan aktivitas spesifiknya 35,42 Unit/mg. Meningkatnya aktivitas enzim pada endapan hingga penambahan ammonium sulfat 70% disebabkan berkurangnya pengotor, seperti non protein (karbohidrat), protein non enzim dan lain-lain (Suhartono 1989). Hasil uji aktivitas kolagenase pada endapan dan supernatan

larutan enzim kolagenase yang ditambah dengan $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ dalam berbagai tingkat kejenuhannya disajikan pada Gambar 1.

Aktivitas kolagenase pada konsentrasi ammonium sulfat tingkat kejenuhan 80% menurun. Penurunan ini disebabkan karena ammonium sulfat tidak bersifat buffer dan dapat membebaskan ammonia, sehingga memungkinkan terjadinya kenaikan pH (Boyer 1993). Ammonium sulfat dipilih karena sifatnya yang mudah larut, murah dan umumnya tidak mempengaruhi struktur protein pada konsentrasi tertentu (Beynon & Bond 2000). Akibatnya, aktivitas enzim menjadi menurun, karena aktivitasnya tersebut dipengaruhi oleh faktor lingkungan, seperti pH. Aktivitas enzim menurun ketika pH lingkungan enzim melebihi pH optimumnya.



Gambar 1 Aktivitas kolagenase (Unit/ml) hasil pemisahan dengan pengendapan menggunakan NH₄(SO₄)₂. ▨ endapan ▩ supernatan

Kim *et al.* (2002) mengendapkan ekstrak kasar kolagenase dari organ dalam ikan filefish (*Novodon modestrus*) menggunakan garam NH₄(SO₄)₂ secara bertingkat dari 30% hingga 80% w/v tingkat kejenuhan. Park *et al.* (2002) menggunakan aseton dingin untuk mengendapkan ekstrak kasar kolagenase dari organ dalam ikan makarel (*Scromber japonicus*). Aktivitas spesifik pada pengendapan ekstrak kolagenase dari ikan *filefish* yaitu 145,34 Unit/mg, lebih besar dibandingkan aktivitas spesifik ekstrak

kasar kolagenase dari ikan makarel, yaitu 42,3 Unit/mg.

Tahapan proses semi purifikasi telah berjalan dengan baik hal ini dapat dilihat dengan peningkatan kelipatan pemurniannya. Kelipatan pemurnian kolagenase hasil semi purifikasi menggunakan ammonium sulfat 70% tingkat kejenuhan adalah 2,374 dari ekstrak kasarnya. Tingkat kelipatan pemurnian kolagenase hasil semi purifikasi kolagenase dari usus ikan bandeng disajikan pada Tabel 1.

Tahapan	Volume (ml)	Aktivitas enzim Unit/ml	Aktivitas (U)	Konsentrasi protein (mg/ml)	Protein (mg)	Aktivitas spesifik U/mg	Derajat kemurnian	Yield
Ekstraksi	450	0,141	63	0,785	353,25	0,178	1,00	100,00
Hasil pengendapan 70% ZA	45	0,496	2,32	1,185	53,325	0,419	2,347	35,42

Suhu optimum kolagenase yang diperoleh adalah sebesar 50 °C. Enzim pada umumnya mempunyai temperatur optimum seperti temperatur sel. Enzim memiliki aktivitas maksimum pada suhu tertentu, dan aktivitasnya meningkat seiring dengan peningkatan suhu hingga mencapai suhu optimum. Setelah kenaikan suhu lebih lanjut, akan menyebabkan aktivitas menurun (Pelezar & Chan 1988). Suhu kolagenase ini lebih tinggi dari suhu optimum kolagenase yang ditemukan pada *rainbow trout* (*Onchorinchus mykiss tail*) yaitu 20 °C. Pada spesies lain, seperti *filefish* (*Novodon modestus*) (Kim *et al.* 2002), mempunyai suhu optimum kolagenase 55 °C. Sedangkan pada udang (*Pandalus eous*) suhu optimum kolagenase 40-45 °C.

Kondisi pH optimum kolagenase hasil pengendapan adalah pH 9. Nilai ini sesuai dengan pernyataan bahwa pada umumnya proteinase dari organ pencernaan hewan laut mempunyai sifat unik, yaitu energi aktivitas Arrhenius yang rendah, konstanta Michaelis-Menten tinggi, stabil pada suhu dingin, mempunyai temperatur optimum yang rendah, bersifat termostabil rendah, mempunyai pH optimum yang tinggi (Simpson 2000). Pada spesies yang

lain, seperti ikan makarel (*Scomber japonicus*) (Park *et al.* 2002) dan ikan tuna (*Thunnus thynnus*) (Byun *et al.* 2002), kolagenase mempunyai pH optimum 7,5. Kolagenase lain, yaitu dari udang (Aoki *et al.* 2003) dan Daging ikan *Pasific rockfish* (*Sebastes sp*) (Brocho & Haard 1995), mempunyai pH optimum 7,5-8,5. Sedangkan kolagenase dari *Bacillus subtilis FS-2* (Nagano & Kim 1999) mempunyai pH optimum 9,0.

Penambahan ion logam Mn^{2+} 1 dan 5 mM menurunkan aktivitas kolagenase hingga aktivitas relatifnya menjadi 83% dan 79%. Penambahan Co^{2+} 1 dan 5 mM mengakibatkan kolagenase mengalami penurunan aktivitas hingga aktivitas relatifnya menjadi 62% dan 61%. Penambahan ion Ca^{2+} pada konsentrasi 1 dan 5 mM dapat meningkatkan aktivitas relatif kolagenase hingga 122% dan 115%. Pada penambahan Na^+ 1 mM aktivitas relatifnya menjadi 115% dan penambahan ion Na^+ hingga aktivitas relatifnya menjadi 130%. Byun *et al.* (2002) melaporkan bahwa kolagenase pada pilorik kaeka tuna (*Thunnus thynnus*), dapat ditingkatkan aktivitasnya dengan penambahan ion Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} dan Ba^{2+} , tetapi dihambat dengan kuat oleh Zn^{2+} , Hg^{2+} dan Cu^{2+} .

Kolagenase hasil pengendapan, penghambatan terhadap PMSF 1 mM dan 5 mM mencapai 30% dan 26% . Tidak ada penghambatan yang berarti terhadap aktivitas kolagenase ketika ditambahkan EDTA 1 dan 5 mM. Aktivitas relatif kolagenase setelah penambahan EDTA adalah sebesar 93-96%. Park *et al.* (2002) melaporkan kolagenase dari organ dalam *Scomber japonicus* digolongkan dalam serin protease, dapat dihambat oleh PMSF 1,0 mM dengan aktivitas relatif sebesar 46,8%. Sedangkan menurut Aoki *et al.* (2003) penambahan PMSF 1 mM dan 10 mM pada kolagenase dari udang (*Pandalus eous*) dapat menghambat hingga aktivitas relatifnya tinggal 5 dan 2%.

Kolagenase stabil pada penyimpanan suhu 10-50 °C. Kolagenase mengalami penurunan aktivitasnya setelah penyimpanan pada suhu 60 °C. Enzim-enzim dari organ pencernaan hewan laut mempunyai sifat bersifat termostabil rendah (Simpson 2000). Kolagenase pada pH 3-4 mempunyai aktivitas yang rendah. Kolagenase mempunyai aktivitas yang masih tinggi pada pH 6-11. Aktivitas tertinggi kolagenase stabil pada pH 8-9. Proteinase dari ikan mempunyai sifat stabil

pada pH netral mendekati basa (Kim *et al.* 2008).

KESIMPULAN

Aktivitas kolagenase hasil semi purifikasi usus ikan bandeng meningkat 2,347 kali dari ekstrak kasarnya. Kolagenase ini mempunyai suhu optimum 50 °C. Kolagenase mempunyai pH optimum 9. Kolagenase ini tergolong dalam enzim yang bekerja dengan optimum pada pH basa atau alkalin protease. Kolagenase meningkat aktivitasnya jika ditambah dengan ion Ca^{2+} dan Na^+ . Kolagenase dihambat dengan baik oleh PMSF sehingga diduga kolagenase ini adalah jenis serin protease. Mengingat pemurnian kolagenase dari ikan bandeng ini belum sempurna, maka disarankan untuk dilakukan pemurnian lebih lanjut dengan metoda yang lain sehingga diharapkan dapat dihasilkan kolagenase murni.

Ucapan Terimakasih

Penelitian ini sebagian dibiayai oleh Dana Hibah Bersaing Batch DP2M-Ditjen Dikti-DEPDIKNAS atas nama Dr. Tati Nurhayati, S.Pi, M.Si.

DAFTAR PUSTAKA

- Aoki H, Ahsan MN, Matsuo K, Hagiwara T, Watanabe S. 2003. Purification and characterization of collagenolytic proteases from the hepatopancreas of northern shrimp (*Pandalus eous*). *J Agric Food Chem*. 51:777-83.
- [BPPT] Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi. 2003. Seminar Industri Enzim dan Bioteknologi. Jakarta: Humas BPPT. http://www.bppt.go.id/index.php?option=com_content&task=view&id=1549&Itemid=30.
- Beynon RJ, Bond JS. 2001. *Proteolysis Enzymes: a Practical Approach*. New York: Oxford University Press.
- Bradford MM. 1967. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal biochem* 72: 234-254
- Boyer RF. 1993. *Modern Experimental Biochemistry*. 2nd ed. Redwoodcity. California: The Benjamin/Cummings Publishing Co. Inc.
- Byun HG, Park JP, Sung NI, Kim SK. 2002. Purification and characterization of a serine proteinase from the tuna piloric caeca. *J Food Biochem*. 26: 479-494.
- Clucas IJ dan Ward AR. 1996. *Post-Harvest Fisheries Development: A Guide to Handling, Preservation, Processing and Quality*. Chantam Maritime, UK: Natural Resources Institute.
- [Ditjen Perikanan Budidaya]. 2007. Kebijakan dan program prioritas tahun 2008. Di dalam *Rakornas Departemen Kelautan dan Perikanan tahun 2007*. Jakarta: Departemen Kelautan dan Perikanan.
- Fentiana N. 2009. Pengaruh enzim protease jeroan ikan bandeng (*Channos channos* Forskal) pada proses kemunduran mutu. [skripsi]. Bogor: Departemen Teknologi Hasil Perairan. Institut Pertanian Bogor.

- Hultmann L, Rustad T. 2004. Iced storage of Atlantic salmon (*Salmo salar*)-effects on endogeneous enzymes and their impact on muscle proteins and texture. *J Food Chemistry*. 87: 31-41
- Hultmann L. 2003. Endogenous proteolytic enzymes - Studies of their impact on fish muscle proteins and texture [thesis]. Norwegian: Faculty of Natural Sciences and Technology. Department of Biotechnology. Norwegian NTNU.
- Kim SK, Park PJ, Kim JB dan Sahidi F. 2002. Purification and characterization of a collagenolytic protease from filefish (*Novodon modestrus*). *J. Biochem Mol Bio* 35: 165-171.
- Kim SK, Mendis E, Shahidi F. 2008. Marine Fisheries By-Products as Potencial Nutraceuticals: Overview. Di dalam Shahidi F, editor. *Marine Nutraceuticals and Funcional Food*. Boca Raton: CRC Press.
- Lopez MD, Carreno LG. 2000. Applications of Fish and Shellfish Enzymes in Food and Feed Products. Di dalam Haard NF dan Simpson BK, editor. *Seafood Enzymes Utilization and Influence on Postharvest Seafood Quality*. New York: Marcel Dekker. Inc. hlm: 571-618.
- Moore S, Stein W. 1954. A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. *J. Biol. Chem.* 211, 907-913. Di dalam Kim SK, Park PJ, Kim JB dan Sahidi F. 2002. Purification and characterization of a collagenolytic protease from filefish (*Novodon modestrus*). *J. Biochem Mol Bio*. 35: 165-171.
- Nagano H, To KA. 1999. Purification of collagenase and specificity of its releted enzyme from *Bacillus subtilis* FS-2. *Bioschi, Biotechnol, Biochem.* 63: 181-183.
- Park PJ, Lee SH, Byun HG, Kim SH, Kim SK. 2002. Purification and characterization of a collagenase from the Mackarel, *Scomber japonicus*. *J Biochem Mol Bio*. 35: 576-582.
- Rilley KM, Herman IM. 2005. Collagenase promotes the celuller responses to injury and wound healing in vivo. *J Burns and Wounds*. 4:112-124.
- Simpson BK. 2000. Digestives Proteinases from Marine Animals. Di dalam: Haard NF dan Simpson BK, editor. *Seafood Enzymes Utilization and Influence on Postharvest Seafood Quality*. New York : Marcel Dekker. Inc. hlm 191-207.
- USDA SR-21. (2009). Fish, milkfish, raw. <http://www.nutritiondata.com/facts/finfish-and-shellfish-products/4079/2> [6 Desember 2009].