

AKTIVITAS ENZIM KATEPSIN PADA IKAN LELE (*Clarias sp.*) PADA PERLAKUAN SUHU DAN SUBSTRAT YANG BERBEDA

ACTIVITIES OF CATFISH (*Clarias sp.*) CATHEPSIN ENZYME WITH DIFFERENT TEMPERATURE AND SUBSTRATES TREATMENT

Anhar Rozi^{1*}, Ikhsanul Khairi¹, Reni Tri Cahyani², Stephani Bija², Nurhikma², Nuring Wulansari³, Deden Yusman Maulid⁴, Siluh Putu Sri Dia Utari⁵, Diah Anggraini Wulandari⁶, Tati Nurhayati⁷

¹Program Studi Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Teuku Umar Meulaboh, Aceh

²Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Borneo Tarakan, Kalimantan Utara

³Pangkalan PSDKP Jakarta, Ditjen PSDKP

⁴Politeknik Kelautan dan Perikanan Pangandaran

⁵Politeknik Kelautan dan Perikanan Jembrana

⁶Pusat Penelitian Bioteknologi, LIPI, Cibinong, Bogor

⁷Departemen Teknologi Hasil Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor

*Korespondensi: anharrozi@utu.ac.id

Abstract

Cathepsin was proteolytic enzyme which is found animal tissues included fish. Cathepsin found in fish muscle tissue, cathepsin and other hydrolyzing enzymes were place in subcellular organelles and divided into two places, that was in muscle fibers and extracellular matrix. The aimed of this study was to the characterization of cathepsin enzyme especially catfish. So that in enviromental condition that can increased the activity of cathepsin enzyme an approtiate handling process can be carried out. The method of analyze enzyme activity, while the measurement of protein concentration refered to Bradford (1976). The treatments in this study was determination temperature (30°C, 40°C, 50°C, dan 60°C) and substrate (1.5% 2%, 2.5%). The result showed of enzyme activity with detrmination temperature very influential and fluctuating, the optimum temperature was 30°C where the activity reaches 0.38 U/ml. The best activity treatment of substrate was 1.5% where the activity reaches 0.42 U/ml. BSA Standard curve with regression equation $y = 0.95x + 0.109$.

Keywords: Cathepsin, enzyme, substrate, temperature

I. Pendahuluan

Lahan budidaya tambak memiliki potensi mencapai 500.000 ha serta dengan produktivitas udang sebesar 2 ton/ha/tahun, sedangkan produksi perikanan air tawar memiliki potensi lebih dari satu juta ton/tahun. Potensi produksi sebesar 356.000 ton/tahun dari perikanan tangkap, total potensi produksi perikanan Indonesia dapat mencapai 9,5 juta ton/tahun (KKP 2011).

Potensi yang dihasilkan dari segi perikanan memiliki permasalahan dimana kemunduran mutu hasil perairan sangat cepat. Kemunduran mutu hasil perairan berlangsung dalam waktu yang sangat cepat, sehingga dibutuhkan penanganan yang baik agar dapat menghambat proses pembusukan secara kimiawi maupun enzimatik (Rehbein 1979). Metode yang paling tepat untuk menghambat

pembusukan ikan adalah dengan menggunakan suhu rendah baik menggunakan es maupun pembekuan. Penggunaan suhu rendah pada produk-produk perikanan mampu menghambat aktivitas enzim dan pertumbuhan bakteri sehingga kemunduran mutu ikan berjalan lebih lambat dan ikan akan tetap segar dalam jangka waktu yang lama (Ilyas 1983). Menurut Stein *et al.* (2005) menyatakan bahwa ikan yang diberi perlakuan penyimpanan suhu rendah dapat diperpanjang daya awetnya hingga mencapai 1-4 minggu, tergantung jenis ikan dan cara penanganannya.

Kemunduran mutu ikan yang paling banyak terjadi melalui proses enzimatis. Protease merupakan enzim yang penting untuk kelangsungan makhluk hidup karena berperan dalam sejumlah reaksi biokimia seluler. Enzim protease diperlukan untuk mendegradasi protein nutrient, enzim protease juga terlibat dalam sejumlah mekanisme patogenitas, proses koagulasi darah, proses sporulasi, diferensiasi, sejumlah proses pasca tranlasi protein dan mekanisme ekspresi protein ekstra seluler. Protease juga mempunyai peranan yang penting dan banyak digunakan dalam industri pangan dan non pangan. Protease dalam industri pangan dimanfaatkan sebagai penjernih bir, membuat kecap, membuat protein hidrolisat, pengempuk daging dan kegunaan lainnya.

Enzim protease yang berperan dalam kemunduran mutu ikan ialah enzim katepsin. Katepsin merupakan enzim proteolitik yang ditemukan pada jaringan hewan termasuk ikan dan banyak ditemukan dalam jaringan otot ikan. Pada jaringan otot ikan, katepsin dan enzim penghidrolisis lainnya ditempatkan dalam organel subseluler dan dibagi dalam dua tempat, yaitu pada serabut otot dan matriks ekstraseluler (Shahidi dan Botta 1994). Aktivitas katepsin memberikan pengaruh pada tekstur daging ikan karena katepsin dapat menurunkan fleksibilitas sehingga daging ikan menjadi tidak elastis dan jaringan daging ikan melunak (Jiang 2000). Enzim katepsin optimal pada pH asam walaupun beberapa diantaranya aktif pada pH yang netral (Haard 1994).

Berdasarkan latar belakang tersebut informasi mengenai kondisi optimal dari enzim katepsin sangat diperlukan. Oleh karena itu dilakukan penelitian tentang karakterisasi enzim katepsin khususnya pada ikan lele. Sehingga pada kondisi lingkungan yang dapat meningkatkan enzim katepsin dapat dilakukan proses penanganan yang tepat.

II. Metode Penelitian

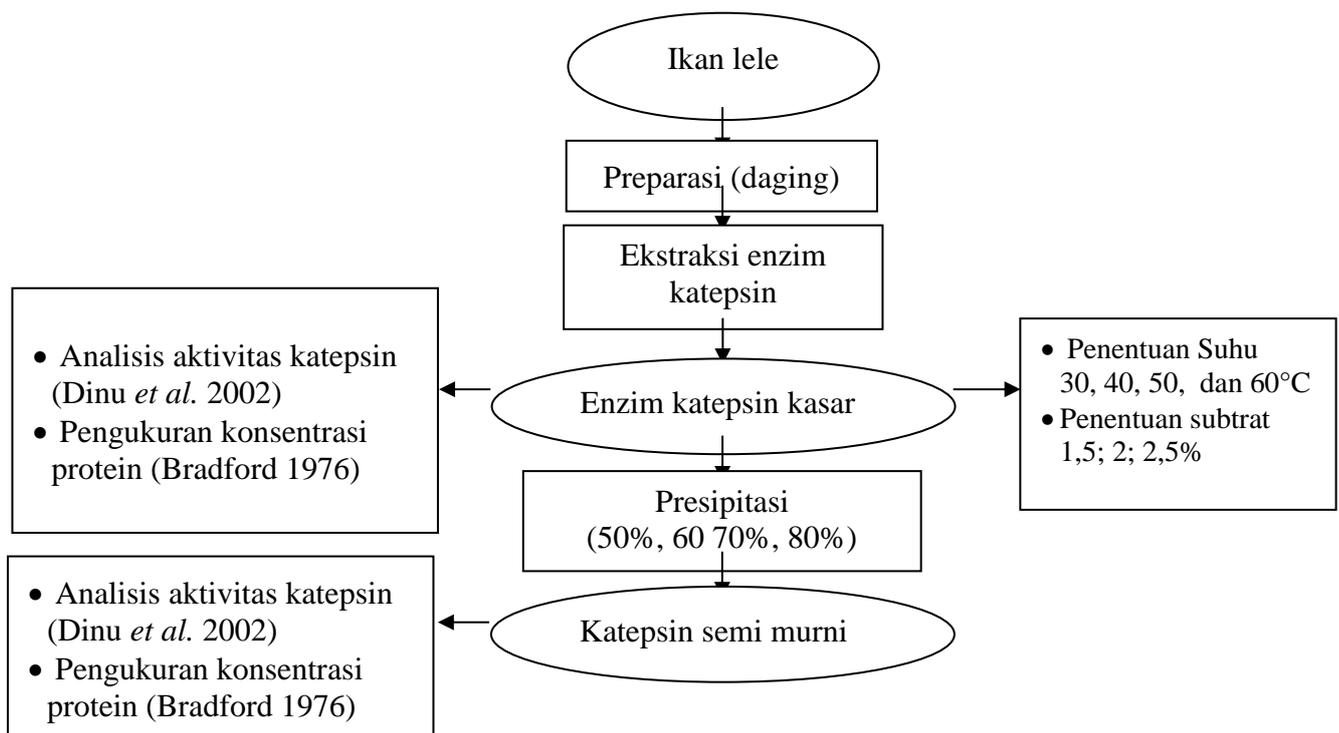
Bahan dan Alat

Bahan yang di gunakan dalam penelitian ini terdiri dari bahan baku ikan lele dalam keadaan *post-rigor*, bahan-bahan untuk ekstraksi kasar (buffer tris Hidrogen Klorida 0,1 M, pH 7,4, aquades), presipitasi (ammonium sulfat teknis), uji aktifitas katepsin [hemoglobin (sigma), buffer tris 0,1 pH 7,4, tirosin (Applichem), akuades, TCA 5%, folin (merck), HCl 1 N], uji kadar protein [pereaksi Bradford, *bovine serum albumin* (applichem)].

Alat yang di gunakan pada penelitian ini antara lain inkubator (Thermoline), sentrifuse dingin, Spektrofotometer UV-Vis 2500 (LaboMed), pH meter, kertas saring Whatman no.1, mikropipet, mikropipet tip, sudip dan erlenmeyer.

Prosedur Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui beberapa tahap, yaitu preparasi sampel berupa ikan lele pada tahap *post-rigor* yang di ambil dagingnya. Tahap selanjutnya yakni pemurnian enzim katepsin semi murni yang meliputi ekstraksi kasar dan presipitasi. Data dianalisa secara deskriptif yang disajikan dalam bentuk tabel dan grafik, kemudian dibahas berdasarkan literatur dan standar yang ada. Tahapan penelitian yang disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1 Diagram alir tahapan penelitian

Ekstraksi katepsin kasar

Ekstraksi dilakukan dengan preparasi sampel untuk memperoleh ekstrak kasar katepsin dengan cara ikan dimatikan, kemudian daging ikan diambil dan dicuci untuk menghilangkan darah. Daging yang telah diambil disuspensikan dalam akuades dengan perbandingan daging ikan dan akuades 1:1 lalu di homogenisasi pada suhu 0-4°C.

Ekstrak daging hasil homogenisasi disentrifugasi pada 600xg, suhu 4°C selama 10 menit dan supernatant yang diperoleh kemudian disentrifugasi lagi pada 10.000xg, 4°C selama 10 menit. Pelet yang di hasilkan dari hasil sentrifugasi kemudian di larutkan dalam buffer tris HCl 0,1 M pH 7,4 dengan jumlah yang sama seperti jumlah aquades dan disentrifugasi pada 4000xg, 4°C selama 10 menit.

Supernatan (ekstrak kasar katepsin) yang diperoleh merupakan protein utama dari mitokondria dan lisosom yang siap di teliti aktivitasnya lebih lanjut.

Presipitasi dan dialisis

Katepsin semi murni diperoleh dengan mengendapkan ekstrak kasar katepsin menggunakan ammonium sulfat dengan tingkat kejenuhan 40%, 50%, 60%, 70% dan 80% (b/v). Pengendapan dilakukan dengan menambahkan garam ammonium sulfat ke dalam supernatant sedikit demi sedikit dan di sentrifugasi pada 12.000xg, 4°C selama 30 menit.

Pelet dilarutkan dalam buffer tris HCl 0,1 M pH 7,4. Langkah selanjutnya adalah dialisis. Dialisis dilakukan dalam bufer tris HCl 0,1 M pH 7,4 menggunakan kantong selofan berukuran 12 kDa, dengan waktu dialisis 2, 4, 6 dan 8 jam. Tahap presipitasi dan analisis ini dilakukan pada suhu ≤ 4 °C. Hasil yang diperoleh dari masing-masing tahap pemurnian, diuji aktivitas enzim dan kadar protein.

Karakterisaasi katepsin

Karakterisasi dilakukan terhadap hasil dialisis dengan aktifitas spesifik yang tertinggi. Karakterisasi meliputi penentuan suhu optimum dan penentuan konsentrasi substrat optimum.

Karakterisasi suhu

Karakterisasi suhu dilakukan dengan variasi suhu inkubasi pada saat pengujian aktivitas katepsin dengan suhu 40, 50, 60 dan 70 °C. Pengujian hemoglobin sebagai substrat dibuat dengan konsentrasi 2% pH 2. Sebanyak 0,5 mL dari larutan substrat, 0,1 mL larutan buffer Tris HCl 0,1 M pH 7,4 diinkubasi dengan 0,1 mL larutan enzim pada variasi suhu 40, 50, 60 dan 70 °C selama 10 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 2 ml TCA 5% (w/v). Campuran disaring dan 1 mL filtrat hasil penyaringan di tambah 1 mL pereaksi folin, selanjutnya diinkubasi kembali pada suhu 37 °C selama 10 menit. Campuran kemudian diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 750 nm. Selain itu, dilakukan pula pengukuran untuk larutan blanko dan larutan standar dengan prosedur yang sama seperti larutan sampel hanya untuk larutan blanko dan larutan standar enzimnya digantikan dengan aquades dan tirosin.

Karakterisasi konsentrasi substrat

Karakterisasi konsentrasi substrat dilakukan dengan mengubah konsentrasi substrat hemoglobin dengan variasi (0,5%, 1%, 1,5%, dan 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, dan 4% b/v). Pada saat pengujian hemoglobin sebagai substratnya dibuat dengan konsentrasi (0,5%, 1%, 1,5%, dan 2%, 2,5%, 3%, 3,5% , dan 4%) pH 2. Sebanyak 0,5 mL dari larutan substrat 0,1 mL larutan bufer Tris HCl 0,1 M pH 7,4 diinkubasi dengan 0,1 mL larutan enzim pada suhu 37°C selama 10 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 2 mL TCA 5% (w/v). Campuran disaring dan 1 mL filtrat hasil penyaringan ditambah 1 mL pereaksi folin, selanjutnya diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 20 menit. Campuran kemudian diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 750 nm. Selain itu, dilakukan pula pengukuran untuk larutan blanko dan larutan standar dengan prosedur yang sama seperti larutan

sampel hanya untuk larutan blanko dan larutan standar enzimnya digantikan dengan akuades dan tirosin.

Analisis

Aktivitas katepsin (Dinu et al. 2002)

Aktivitas proteolitik dari katepsin diuji menggunakan hemoglobin sebagai substratnya dengan konsentrasi 2% pH 2. Sebanyak 0,5 mL dari larutan substrat 0,1 mL larutan buffer Tris HCl 0,1 M pH 7,4 di inkubasi dengan 0,1 mL larutan enzim pada suhu 37 °C selama 10 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 2 mL TCA 5% (w/v). Campuran disaring dan 1 ml filtrat hasil penyaringan di tambah 1 mL pereksi folin. Campuran kemudian diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 750 nm. Selain itu, dilakukan pula pengukuran untuk larutan blanko dan larutan standar dengan prosedur yang sama seperti larutan sampel hanya untuk larutan blanko dan larutan standar enzimnya digantikan dengan akuades dan tirosin. Unit aktivitas di definisikan sebagai banyaknya enzim yang dapat mengubah substrat menjadi 1 µmol tirosin dalam 1 menit.

Aktivitas enzim katepsin dapat dihitung dengan rumus berikut :

$$UA = \frac{(\text{Abs. sampel} - \text{abs. blanko})}{(\text{Abs. standar} - \text{abs. blanko})} \times P \times \frac{1}{T}$$

Keterangan :

UA : jumlah tirosin yang dihasilkan per ml enzim permenit

P : faktor pengenceran

T : waktu inkubasi

Pengukuran konsentrasi protein (Bradford 1976)

Konsentrasi protein ditentukan menggunakan metode Bradford dengan *bovine serum albumin* sebagai standar. Persiapan pereaksi Bradford dilakukan dengan cara melarutkan 5 mg *coomasie brilliant blue G-250* dalam 2,5 mL etanol 95% (v/v), lalu ditambahkan dengan 5 mL asam fosfat 85% (v/v). Jika telah larut lalu ditambahkan akuades hingga 250 mL dan disaring dengan kertas saring whatman no. 1 dan diencerkan 5 kali sesaat sebelum digunakan.

Konsentrasi protein ditentukan menggunakan metode Bradford dengan cara 0,1 mL enzim dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan sebanyak 5 mL pereaksi Bradford, diinkubasi selama 5 menit dan diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm. Larutan standar dilakukan sama seperti larutan sampel dengan konsentrasi antara 0,1-1,0 mg/mL. Tahap berikutnya adalah membuat kurva standar dengan absorbansi sebagai ordinat (sumbu y) dan konsentrasi protein sebagai absis (sumbu x). Berdasarkan kurva tersebut dapat di tentukan konsentrasi protein sampel. Tabel komposisi volume larutan dengan pembuatan larutan standar dengan konsentrasi 0,01-0,3mg/mL dari larutan stok BSA konsentrasi 2 mg/mL di sajikan pada Tabel 1.

Tabel 1 Pembuatan larutan standar BSA konsentrasi 0.01-0,3 mg/mL

Konsentrasi (mg/mL)	BSA	Volume BSA (mL)	Volume akuades (mL)
0,01		0,01	1,99
0,02		0,02	1,98
0,03		0,03	1,97
0,04		0,04	1,96
0,05		0,05	1,95
0,06		0,06	1,94
0,07		0,07	1,93
0,08		0,08	1,92
0,09		0,09	1,91
0,10		0,10	1,90

Penentuan berat molekul dengan SDS-PAGE

Konsentrasi gel akrilamid dalam analisis SDS-PAGE adalah 4% stacking gel dan 10% separating gel. Metode ini menggunakan matriks dari gel yang disusun oleh akrilamida dan N,N'-metilen-bis-akrilamida yang berpolimerisasi melalui mekanisme radikal bebas dengan bantuan katalisator N,N,N',N'-tetramethylene-diamine (TEMED) dan inisiator ammonium persulfat (APS) (Rosenberg 1996). Komposisi pembuatan gel penahan dan pemisah SDS-PAGE dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2 Komposisi gel penahan dan pemisah SDS-PAGE

Komponen	Gel pemisah (8%)	Gel penahan (4%)
Larutan stok akrilamida	2,66 ml	0,67 ml
Buffer gel pemisah	2,50 ml	-
Buffer gel pengumpul	-	1,25 ml
Akuades	3,18 ml	3,00 ml
Ammonium persulfat	50.00 µl	50.00 µl
TEMED	5.00 µl	5.00 µl

Konsentrasi akrilamida yang digunakan dalam analisis ini adalah 10% (w/v). Pewarnaan yang digunakan adalah pewarnaan perak. Pendeteksian SDS-PAGE dilakukan dengan melepaskan gel hasil elektroforesis dari cetakan dan diukur jarak migrasi brompenol blue. Gel tersebut dicelup dan direndam dalam larutan fiksasi (25% metanol + 12% asam asetat) selama 1 jam digoyang konstan. Kemudian direndam dalam 50% (v/v) etanol selama 2x20 menit. Larutannya diganti dengan larutan pengembang kemudian dicuci dengan akuabidestilata. Hasil cucian tersebut ditambahkan larutan perak nitrat selama 30 menit kemudian dicuci lagi dengan akuabidestilata 2x20 detik dan ditambahkan larutan campuran Na₂CO₃ dan formal dehidat dan terakhir dengan larutan fiksasi.

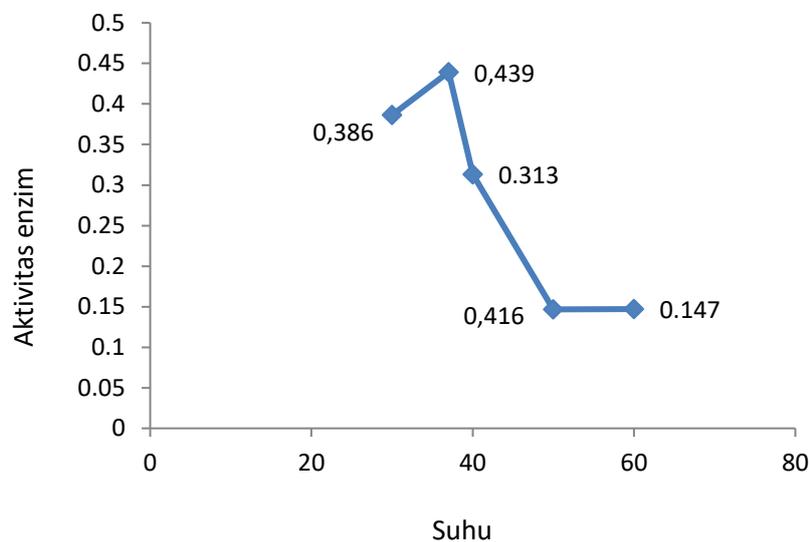
III. Hasil dan Pembahasan

Karakterisasi Enzim Katepsin

Enzim merupakan biokatalisator yang bersifat spesifik. Aktivitas enzim sangat dipengaruhi oleh kondisi lingkungan. Tujuan karakterisasi enzim katepsin ini adalah untuk mengetahui kondisi optimum dari kerja enzim tersebut.

Pengaruh suhu terhadap enzim katepsin

Suhu sangat mempengaruhi aktivitas enzim, karena enzim tersusun dari protein. Pengaruh suhu terhadap enzim katepsin mengakibatkan aktivitasnya mengalami fluktuasi. Peningkatan suhu akan meningkatkan aktivitas enzim katepsin sampai dengan suhu optimum, peningkatan suhu lebih tinggi mengakibatkan aktivitas enzim katepsin menurun. Aktivitas optimum enzim katepsin pada suhu 37°C dengan nilai sebesar 0,439 U/ml. Pada perlakuan suhu menghasilkan nilai optimum pada suhu 30°C, dimana aktivitasnya mencapai 0,386 U/ml. Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim katepsin ikan lele disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2 Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim katepsin

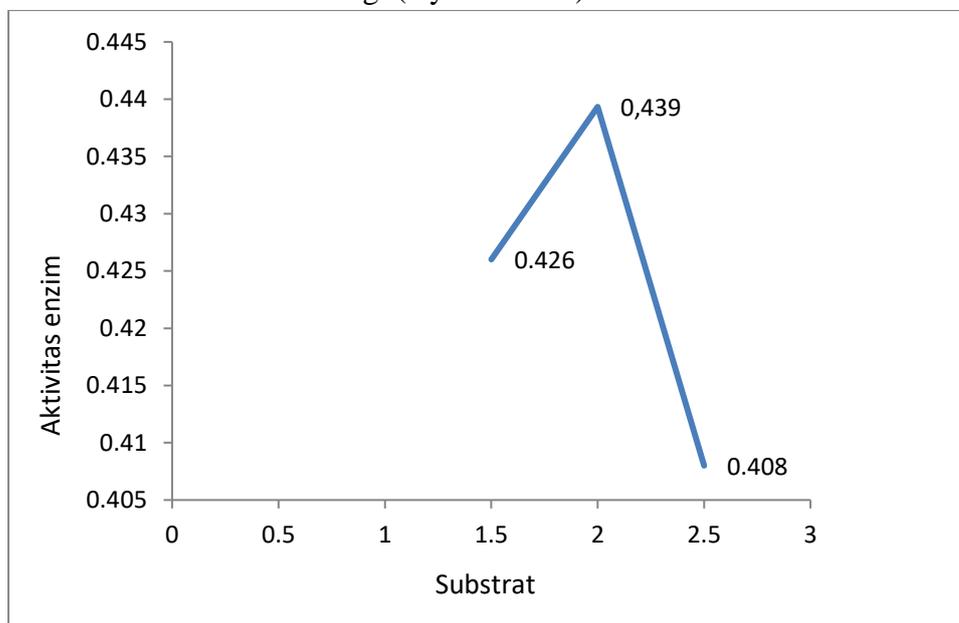
Aktivitas optimum pada setiap enzim termasuk katepsin dicapai pada kisaran suhu tertentu. Hal ini terjadi karena suhu menyediakan pasokan energi termal untuk memecah beberapa atraksi intramolekul grup polar (ikatan hidrogen, atraksi dipol-dipol, interaksi inonik) serta kekuatan hidropobik diantara grup non polar di dalam struktur enzim. Aktivitas enzim katepsin berkurang pada suhu rendah dan optimum pada pH yang sesuai (Hultman dan Rustad 2007).

Suhu yang lebih tinggi akan membuat 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. Kenaikan suhu melebihi titik tertentu akan menyebabkan gangguan terhadap struktur tersier enzim. Perubahan struktur tersier pada sisi aktif akan menghambat aktivitas katalitik enzim (Stoker 2010).

Pengaruh konsentrasi substrat terhadap enzim katepsin

Substrat merupakan faktor yang sangat berpengaruh terhadap hasil atau jumlah produk akhir yang dihasilkan oleh enzim. Enzim membutuhkan substrat yang memberikan sisi aktif enzim sehingga membentuk produk. Penambahan konsentrasi substrat pada reaksi yang dikatalis oleh enzim awalnya akan meningkatkan laju reaksi. Konsentrasi substrat dinaikkan untuk lebih lanjut sehingga laju reaksi akan mencapai titik jenuh dan tidak bertambah lagi. Konsentrasi substrat dan enzim sudah seimbang, laju reaksi akan relatif lebih konstan. Gambar 3 menunjukkan pengaruh substrat terhadap aktivitas enzim katepsin ikan bawal. Aktivitas optimum enzim katepsin pada substrat 2% dengan nilai 0,439 U/ml. Pada perlakuan substrat 1,5% dan 2,5%, aktivitas yang terbaik terdapat pada pemberian substrat 1,5% dimana aktivitasnya mencapai 0,426 U/ml.

Hemoglobin adalah kompleks protein-pigmen yang mengandung zat besi. Kompleks tersebut berwarna merah dan terdapat didalam eritrosit. Molekul hemoglobin memiliki empat gugus haeme yang mengandung besi fero dan empat rantai globin (Brooker 2001). Reaksi dengan kosentrasi enzim yang lebih sedikit dibandingkan substrat, kemudian ditambahkan enzim akan meningkatkan laju reaksi. Laju peningkatan reaksi akan linier, jika kosentrasi substrat dan enzim sudah seimbang, laju reaksi yang terjadi akan relatif stabil. Penambahan kosentrasi substrat pada suatu reaksi katalis oleh enzim pada awalnya akan meningkatkan laju reaksi. Kosentrasi substrat dinaikkan lebih lanjut, laju reaksi akan mencapai titik jenuh dan tidak ditambahkan lagi (Dynnar 2011).



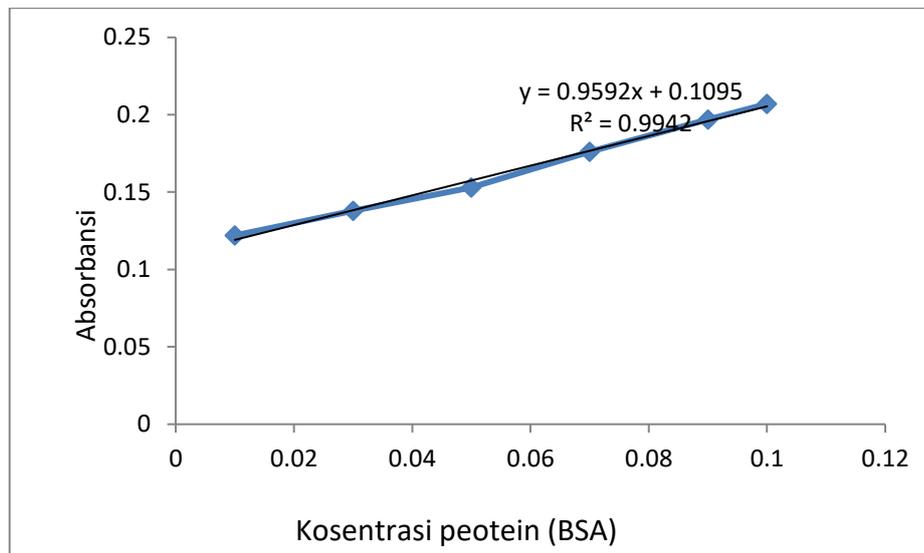
Gambar 3 Pengaruh substrat terhadap aktivitas enzim katepsin

Uji Konsentrasi Protein

Uji Bradford adalah suatu uji untuk mengukur konsentrasi protein total dengan secara kolorimetri dalam suatu larutan. Pengujian Bradford melibatkan pewarna *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) yang berikatan dengan protein dalam suatu larutan

yang bersifat asam sehingga memberikan warna (kebiruan). Warna yang dihasilkan dari penambahan larutan tersebut sehingga secara kolorimetri dapat diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometri (Lambert-Beer) pada panjang gelombang 465-595 nm (cahaya tampak).

Dari hasil pembacaan spektrofotometri larutan standar BSA maka diperoleh kurva standar yang ditunjukkan pada gambar 4.

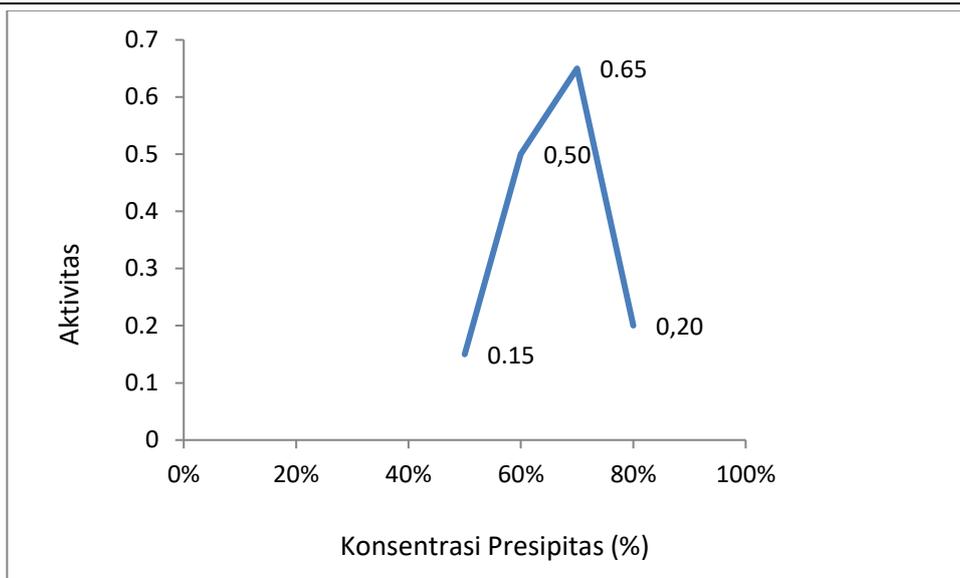


Gambar 4 Pembacaan spektrofotometri larutan standar BSA

Dari nilai absorbansi standar BSA, maka diperoleh kurva standar BSA dengan persamaan regresi $y = 0,959x + 0,109$. Konsentrasi protein yang digunakan dari 0,01, 0,03, 0,05, 0,07, 0,09 dan 0,1 dengan nilai absorbansi sampel secara berturut-turut 0,122, 0,138, 0,153, 0,176, 0,197, 0,207 dari ekstrak enzim yang diperoleh dari ikan lele, lalu dimasukkan ke dalam persamaan regresi, maka kadar protein akan diketahui.

Presipitasi

Ekstrak kasar yang diperoleh selanjutnya dipresipitasi menggunakan amonium sulfat. Metode yang digunakan untuk presipitasi protein berdasarkan hipotesis pengendapan yang disebabkan oleh interaksi diantara protein dan agen presipitasi. Presipitasi dilakukan menggunakan garam amonium sulfat dengan kejenuhan 50-80%. Grafik kadar protein enzim hasil presipitasi dengan amonium sulfat dapat dilihat pada Gambar 5. Presipitasi protein memiliki karakteristik pada konsentrasi reagen yang berbeda pada amonium sulfat dan persen presipitasi berselang antara 20%-100% (Bissawanger 2004).



Gambar 5. Grafik presipitasi enzim katepsin

Peningkatan aktivitas pada beberapa tingkat konsentrasi ammonium sulfat dan mencapai aktivitas optimum pada dengan konsentrasi ammonium sulfat 70% dengan aktivitas 0,65 U/ml. Kosentrasi 80% aktivitas menurun yang di duga pengendapan protein selain dipengaruhi oleh ion garam dari atau konsentrasi dari garam juga dipengaruhi oleh pH dan suhu tertentu, pH yang digunakan serta suhu yang digunakan nantinya akan sejalan dengan peningkatan konsentrasi garam (*salting in*).

Presipitasi protein dapat dilakukan dengan penambahan garam. Ekstrak kasar enzim katepsin ditambahkan garam untuk memperoleh enzim semi murni. Garam-garam pengotor yang masih tersisa pada hasil presipitasi dihilangkan dengan melakukan dialisis.

IV. Kesimpulan

Kesimpulan

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa kondisi optimum enzim katepsin dari ikan bawal adalah pada suhu 30⁰C dan substrat 1,5%. Nilai absorbansi standar BSA diperoleh kurva standar BSA dengan persamaan regresi $y = 0,959x + 0,109$. Aktivitas pada beberapa tingkat konsentrasi ammonium sulfat dan mencapai aktivitas optimum pada dengan konsentrasi ammonium sulfat 70%.

Daftar Pustaka

- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 72: 234-254.
- Dinu D, Dumitru IF, Nechifor MT. 2002. Isolation and characterization of two cathepsin from muscle of *Carratius auratus gibellio*. *Roum. Biotechnol. Lett.* Vol 7. (3): 753-758.

- Dynnar N. 2011. Pemurnian Dan Karakterisasi Enzim Katepsindari Ikan Bandeng (*Chanos Chanos* Forskall). [Skripsi] Departemen Teknologi Hasil Perairan, Fakultas Perikanan Dan Ilmu Kelautan. IPB
- Harrd NF. 1994. *Protein Hydrolysis in a Seafood*. Glasgow: Blackie Academic and Professional.
- Hafiludin. 2009. Pemurnian dan karakterisasi enzim protease katepsin dari ikan mas (*Cyprinus carpio*). Jurusan Ilmu Kelautan Fakultas Pertanian Universitas Trunojoyo Madura. Kamal Bangkalan.
- Hultman L, Rustad T. 2004. Iced stroge of atlantic salmon (*Salmo salar*)- effects on endogenous enzymes and their impact on muscle proteins and texture. *Food Chemistry*. 87: 31-41.
- Ilyas S. 1983. *Teknologi Refrigrasi Hasil Perikanan Jilid 1. Teknik Pendinginan Ikan*.:CV. Paripurna.
- Jiang ST, Lee JJ, Chen HC. 1994. Purification and characterization of cathepsins B from ordinary muscle of mackerel (*Scomber australasicus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 42. 1073–1079.
- Kirschke H. 1998. Cathepsin L. In :Barrt, A.J. Rawlings, N.D. Woessner, FF. (Eds), *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Acedemic Press, California, ppp. 617-621.
- [KKP] Kementerian Kelautan dan Perikanan. 2011. Statistik perikanan tangkap Indonesia 2010. Jakarta: Direktorat Jenderal Perikanan Tangkap.
- Li S, Shou X, Zhang N, Liu H, Ma C. 2008. Purification and characterizzation of chatepsin L2 from dorsal muscle of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Journal Food Chemestry*.
- Nurhayati T, Salamah E, Ifran M, Nugraha R. 2010. Aktivitas enzim katepsin dan kolagenase pada kulit ikan bandeng (*Chanos chanos*, Forskal) selama priode kemunduran mutu. *Jurnal Sumberdaya Perairan*. ISSN 1978-1652.
- Shahidi F, Botta JR. 1994. *Seafood : Chemistry, Processing Technology and Quality*. Glasgow: Blackie Academic and Professional.
- Stein LH, Hirmas E, Mevik MB, Karlsten R, Nortved R, Bencze AM, Sunde J, Kiessling A. 2005. The effects of stress and storage temperature on the colour and texture of pre-rigor filleted farmed cod (*Gadus morhua* L.). *Aquaculture Research* 36:1197-1206.
- Stoker HS. 2010. *General, Organic, and Biological Chemistry*. USA: Cengage Learning.
- Rehbein H. 1979. Development of an enzymatic method to differentiate fresh and sea-frozen and thawed fish fillets. *Z Lebensm Unters Forsch* 169:263-265.
- Visessanguan X, Benjakul S, An H. 2003. Purification and characterizzation of chatepsin L in arrowtooth flounder (*Atherethes stomias*) muscle. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*. 134: 477-487.