

PENENTUAN KONDISI OPTIMUM PRODUKSI ENZIM KERATINASE OLEH *Actinobacillus* spp. MENGGUNAKAN TEPUNG BULU AYAM SEBAGAI SUBSTRAT PADA FERMENTASI MEDIA CAIR

Desi Susanti, S.Pt, MP^{1*} Suci Rahmi, S.TP.,M.Si²

Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Teuku Umar,
Alue Peunyareng, Meureubo, Aceh Barat 23681, Indonesia

*Email : desisusanti@utu.ac.id

Tanggal submit: 18 juni 2021; Tanggal penerimaan: 18 Juni 2021

ABSTRAK

Keratinase merupakan enzim monomerik yang dapat menghidrolisis protein keratin yang terdapat pada bulu ayam. Diperkirakan sekitar 90% protein yang terkandung pada bulu ayam adalah protein keratin. Protein ini sulit dicerna oleh karena kuatnya ikatan silang disulfida dan ikatan hidrogen. Pengolahan tepung bulu ayam secara enzimatik melalui proses fermentasi menghasilkan tepung bulu ayam yang tinggi kandungan proteinnya. Beberapa faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim keratinase antara lain: dosis inokulum, suhu, pH, konsentrasi substrat, konsentrasi enzim, dan lama fermentasi. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan kondisi fermentasi (pH, konsentrasi substrat, dosis inokulum dan lama fermentasi) *Actinobacillus* spp. dalam memproduksi enzim keratinase tepung bulu ayam sebagai substrat dalam medium cair. Bahan utama yang digunakan pada penelitian ini adalah : tepung bulu ayam, {nutrient agar (NA), yeast ekstrak 1 gr/l, pepton 5 gr/L, K₂HPO₄ 1 gr/L, MgSO₄·7H₂O 0,2 gr/L, CaCl₂ 0,1 gr/L, Na₂CO₃ dalam 1000 ml air desilata dan bakteri *Actinobacillus* spp. Penelitian ini menggunakan metode eksperimen dengan 4 perlakuan yang terdiri dari pH (9,0; 9,5; 10; 10,5 dan pH 11), konsentrasi substrat (0,5%; 1%; 1,5%; 2%; 2,5%), dosis inokulum (1 mL, 1.5 mL, 2 mL, 2.5 mL, 3 mL) dan lama fermentasi 1 sampai 7 hari, setiap perlakuan diulang sebanyak 3 kali. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kondisi optimum fermentasi *Actinobacillus* spp. dalam memproduksi enzim keratinase pada pH 9 dengan aktivitas enzim keratinase 2 unit/mL, konsentrasi substrat 1% dengan aktivitas enzim keratinase 2.2 unit/mL, dosis inokulum 1.5 mL dengan aktivitas enzim keratinase 10 unit/ ml, dan lama fermentasi 2 hari dengan aktivitas enzim keratinase 3 unit/mL.

Kata Kunci : *Actinobacillus* spp.; tepung bulu ayam; aktivitas enzim keratinase; kondisi optimum.

ABSTRACT

Keratinase is a monomeric enzyme that can hydrolyze the keratin protein found in chicken feathers. It is estimated that about 90% of the protein contained in chicken feathers is keratin protein. It is difficult to digest because of the strong disulfide cross-links and hydrogen bonds. Enzymatic processing of chicken feather flour by fermentation process obtained chicken feather flour which is high in protein content. Several factors that affect the activity of the keratinase enzyme include: inoculum dose, temperature, pH, substrate concentration, enzyme concentration, and fermentation time. This study aimed to obtain the fermentation conditions (pH, substrate concentration, inoculum dose and fermentation time) of *Actinobacillus* spp. in producing chicken feather flour keratinase enzyme as a substrate in liquid medium. The main ingredients used in this study were: chicken feather flour (nutrient agar (NA), yeast extract 1 gr/l, peptone 5 gr/l, K₂HPO₄ 1 gr/l, MgSO₄·7H₂O 0.2 gr/l, CaCl₂ 0, 1 gr/l, Na₂CO₃ in 1000 mL distilled water and *Actinobacillus* spp. This study used an experimental method with 4 treatments consisting of pH (9.0; 9.5; 10; 10.5 and pH 11), substrate concentration (0.5%; 1%; 1.5%; 2%; 2.5%), inoculum dose (1 mL, 1.5 mL, 2 mL, 2.5 mL, 3 mL) and fermentation time 1 to 7 days, each treatment repeated 3 times. The results showed that the optimum conditions of fermentation of *Actinobacillus* spp. in producing keratinase enzyme pH 9 with keratinase enzyme activity 2 units/mL, substrate concentration 1% with keratinase enzyme activity 2.2 units/mL, inoculum dose 1.5 mL with keratinase enzyme activity 10 units/mL, and fermentation time of 2 days with the activity of the enzyme keratinase 3 units/mL.

Keyword : *Actinobacillus* spp.; chicken feather flour; keratinase enzyme activity; optimum condition

PENDAHULUAN

Enzim adalah sekelompok protein yang berfungsi sebagai katalisator untuk berbagai reaksi kimia dalam sistem biologik (Rifell dan Brandelli, 2006). Pada reaksi yang dikatalisasi oleh enzim, molekul awal reaksi disebut substrat, dan enzim mengubah molekul awal tersebut menjadi molekul – molekul yang berbeda, rata-rata semua proses biologis sel memerlukan enzim agar dapat berlangsung dengan cepat (Prasetya, 2011). Aktivitas enzim sangat spesifik karena pada umumnya enzim tertentu hanya akan mengkatalis satu reaksi saja (Sinoy *et al.*, 2011)

Secara umum, enzim dapat diproduksi oleh mikroorganisme. Enzim-enzim mikrobial dapat diklasifikasikan berdasarkan lokasinya menjadi 2 kelompok yaitu enzim intraseluler dan enzim ekstraseluler (Sinoy *et al.*, 2011). Enzim yang diproduksi secara ekstraseluler lebih menguntungkan untuk diaplikasikan pada pakan ternak dibandingkan enzim intraseluler, karena enzim ekstraseluler lebih tinggi aktivitasnya, mudah diproduksi, mudah diaplikasikan dan lebih stabil (Vigneshwaran *et al.*, 2010; Kanmani *et al.*, 2011). Adapun faktor-faktor yang mempengaruhi produksi enzim adalah pH, dosis inokulum, lama fermentasi, dan konsentrasi substrat (Prasetya, 2011).

Enzim keratinase merupakan enzim monomerik, enzim ini dapat menghidrolisis protein keratin yang terdapat pada bulu ayam (Suntorsuk *et al.*, 2004). Diperkirakan sekitar 90% protein yang terkandung pada bulu ayam adalah protein keratin, protein ini sulit dicerna oleh karena kuatnya ikatan silang disulfida dan ikatan hidrogen. Selain itu protein keratin tahan terhadap enzim pepsin dan renin. Pengolahan tepung bulu ayam secara biologis dengan perlakuan enzim keratinase yang dihasilkan oleh mikroorganisme selama proses fermentasi pada kondisi optimum, menghasilkan tepung bulu yang tinggi kualitasnya (Zang *et al.*, 2009).

Aktivitas enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain: dosis inokulum, suhu, pH, konsentrasi substrat, konsentrasi enzim, dan lama fermentasi. Salah satu faktor penentu dalam keberhasilan memproduksi enzim adalah pH awal fermentasi, pH awal fermentasi strain *Basillus* sp. FK 46 adalah 7.5 setelah 5 hari inkubasi (Suntorsuk *et al.*, 2005). Sinoy *et al.* (2011) mengemukakan pH

optimum enzim keratinase adalah 8.6 berbeda dengan pernyataan Zang *et al.*, (2009) bahwa pH optimum enzim keratinase adalah 7.5. Cepat lambatnya fermentasi sangat menentukan jumlah enzim yang dihasilkan, semakin lama waktu fermentasi yang digunakan akan semakin banyak bahan yang dirombak oleh enzim (Dwijoseputro, 2003). Zan *et al.* (2009) menyatakan aktivitas enzim keratinase hampir maksimal pada hari ke 4 sampai hari ke 5 fermentasi, sedangkan Riffel dan Brandelli, (2006) menemukan bahwa aktivitas enzim alkalin protease akan stabil setelah 3 hari fermentasi. Berdasarkan uraian diatas, maka dilakukan penelitian yang bertujuan untuk menentukan kondisi optimum produksi enzim keratinase oleh *Actinobacillus* spp. menggunakan tepung bulu ayam sebagai substrat pada fermentasi media cair.

METODE PENELITIAN

Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah menggunakan metode eksperimen dengan 4 perlakuan (pH, konsentrasi substrat, dosis inokulum dan lama fermentasi) dan 3 ulangan.

Bahan

Bahan yang digunakan adalah tepung bulu ayam yang diambil dari tempat pemotongan ayam broiler. NA (*Nutrient Agar*), akuades dan zat-zat yang digunakan untuk medium cair. Organisme yang dipakai adalah *Actinobacillus* spp.

Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi gelas ukur, gelas piala, batang pengaduk, *autoclave* merk All American tipe 75X, oven UN 55 53L, petridish dan spektrofotometer.

Prosedur Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dengan dua tahapan yaitu :tahapan persiapan yang terdiri dari: persiapan tepung bulu ayam (TBA), persiapan media agar, peremajaan *Actinobacillus* spp. dan penyiapan inokulum. Tahapan yang kedua yaitu tahapan pelaksanaan penelitian dan pengukuran aktivitas enzim keratinase.

Tahapan Persiapan

Bulu ayam diperoleh dari tempat pemotongan ayam broiler, bulu ayam dikumpulkan dengan cepat setelah pemotongan, kemudian dibersihkan. Selanjutnya sampel dikeringkan dalam oven pada suhu 60°C sampai kering. Kemudian bulu ayam diblender dan diayak dengan ayakan ukuran 2-3 mesh.

Persiapan media agar yaitu sebanyak 40 gram NA ditimbang dan dilarutkan kedalam 1000 mL aquades, dimasak secara perlahan sampai berwarna bening. Kemudian disterilisasikan dalam *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121°C. NA yang telah disterilisasikan dipindahkan ke *petridish* steril dan dibiarkan dingin.

Peremajaan *Actinobacillus* spp. dengan cara mengambil *Actinobacillus* spp. dari medium agar lalu diinokulasi dengan metode *strike* secara merata menggunakan jarum ose pada media NA. Kemudian diinkubasi selama 5 hari pada suhu ruang sehingga permukaan agar dipenuhi oleh bakteri.

Penyiapan Inokulum sebagai berikut: isolat murni bakteri yang telah dipindahkan pada agar disuspensikan dengan akuades murni, 1 mL suspensi bakteri 1×10^6 sel/mL dengan volume 10 mL, kemudian diinkubasi selama 48 jam.

Tahapan Pelaksanaan

Persiapan medium fermentasi

Prosedur penelitian diawali dengan persiapan media cair yang mengandung tepung bulu ayam 1% (pada penentuan konsentrasi substrat sesuai dengan variasi perlakuan), *yeast extract* 1 gr/l, pepton 5 gr/l, K_2HPO_4 1 gr/l, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2 gr/L, $CaCl_2$ 0,1 gr/L, Na_2CO_3 dalam 1000 mL air desilata dengan kondisi optimum yang berbeda – beda antara lain pH (9,0; 9,5; 10; 10,5 dan pH 11), konsentrasi substrat (0,5%; 1%; 1,5%; 2%; 2,5%), dosis inokulum (1 mL, 1.5 mL, 2 mL, 2.5 mL, 3 mL) dan lama fermentasi 1 sampai 7 hari. pengaturan pH dilakukan dengan penambahan NaOH atau HCl. Media disterilkan, setelah dingin 10 mL larutan tersebut dipindahkan ke dalam tabung reaksi yang berukuran 25 mL kemudian diinokulasi dengan bakteri *Actinobacillus* spp.

Fermentasi tepung bulu ayam (TBA)

Fermentasi tepung bulu ayam oleh *Actinobacillus* spp. untuk memproduksi enzim keratinase dilakukan pada suhu 27°C dalam *rotary shaker* pada putaran 90 rpm pada lama fermentasi optimum sesuai dengan variasi

perlakuan, setelah itu diukur aktivitas enzim keratinase.

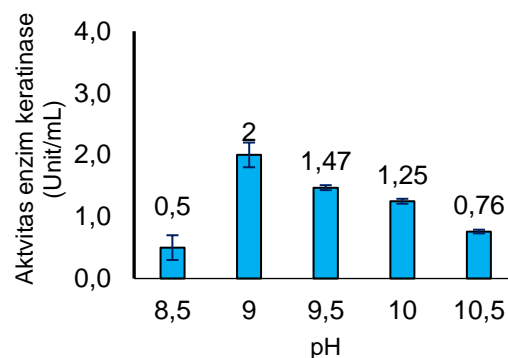
Pengukuran Aktivitas enzim keratinase

Keratin azura (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) digunakan sebagai substrat yang disuspensikan didalam 0,01 M buffer Tris-HCl, pH 7.5 dengan konsentrasi 4 mg/mL. Campuran substrat yang mengandung 1 mL larutan enzim dan 1 mL Keratin azura suspensi. Reaksi diinkubasi pada suhu 50°C (dalam *water bath*) dengan agitasi 300 rev/min selama 1 jam. Setelah inkubasi, campuran substrat dipanaskan selama 5 min, dan disentrifus dengan kecepatan 4000 rpm selama 15 min untuk memisahkan substrat. Supernatan yang terbentuk diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 595 nm. Satu unit (U) aktivitas keratinase ditentukan sebagai jumlah enzim yang menyebabkan peningkatan absorbansi 0.1 diantara sampel dan kontrol pada 595 nm selama 1 jam (Letourneau *et al.*, 1998).

HASIL DAN PEMBAHASAN

pH Optimum

Derajat keasaman (pH) dapat mempengaruhi aktivitas enzim. Suntorsuk and Suntorsuk (2005) melaporkan bahwa pH awal medium sangat mempengaruhi pertumbuhan bakteri, persentase degradasi bulu ayam dan produksi enzim keratinase. Pengukuran aktivitas enzim keratinase digunakan untuk menentukan pH optimum produksi enzim keratinase oleh *Actinobacillus* spp. pada fermentasi medium cair menggunakan bulu ayam sebagai substrat. Aktivitas enzim keratinase pada pH yang berbeda-beda (9,0; 9,5; 10; 10,5 dan pH 11) dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Aktivitas enzim keratinase yang diproduksi oleh *Actinobacillus* spp. menggunakan TBA 1% dengan pH yang berbeda.

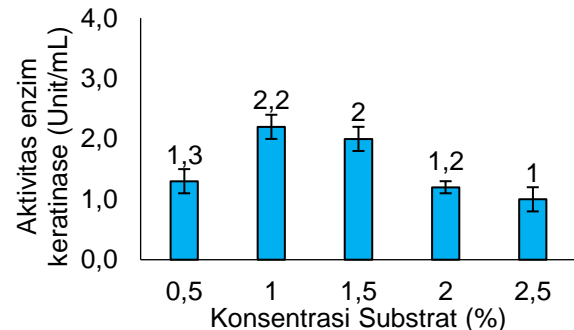
Pada Gambar 1 terlihat bahwa aktivitas enzim keratinase bervariasi dengan adanya perubahan pH. Hal ini terjadi karena adanya perubahan struktur sekunder dan tersier enzim, dengan semakin meningkatnya pH, aktivitas enzim keratinase juga meningkat (Sinoy *et al.*, 2011). Aktivitas enzim keratinase optimum pada pH 9.0 yaitu sebesar 2 Unit/ml. Hasil yang sama juga ditemukan oleh Agustien *et al.* (2010) pH optimum untuk produksi enzim keratinase oleh *Actinobacillus* spp. termofilik adalah 9.0 dengan aktivitas enzim keratinase 1,97 Unit/mL. Hal ini disebabkan karena pada kondisi pH 9.0 gugus pemberi dan penerima proton yang penting pada sisi katalitik enzim berada pada kondisi yang tepat sehingga aktivitas katalitiknya tinggi, selain itu pada pH yang optimum muatan gugus samping asam amino berada pada keadaan yang sesuai sehingga enzim sangat efisien dalam mempercepat reaksi yang sangat spesifik (Siswanto dan Yohanes, 2009). Aktivitas enzim keratinase menurun dengan peningkatan pH di atas pH optimum. Sesuai dengan pernyataan Mazotto *et al.* (2011) bahwa perubahan pH dapat menyebabkan turunnya aktivitas enzim karena adanya perubahan ionisasi gugus-gugus fungsionalnya. Menurut Murray *et al.* (2006) penurunan aktivitas enzim dengan peningkatan pH di atas pH optimum disebabkan oleh denaturasi protein enzim yang mengakibatkan ionisasi pada sisi aktif enzim, ionisasi pada substrat, dan mempengaruhi konformasi enzim dan substrat.

Konsentrasi Substrat Optimum

Hasil penelitian penentuan konsentrasi substrat optimum yang diproduksi oleh *Actinobacillus* spp. menggunakan tepung bulu ayam sebagai substrat dapat dilihat pada Gambar 2.

Aktivitas enzim tertinggi pada hasil penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 2 adalah 2.2 unit/mL pada konsentrasi 1% TBA. Hasil yang sama juga dilaporkan oleh Marzuki (2015), dimana jumlah tepung bulu ayam sebanyak 1% menghasilkan protein keratinase tertinggi dari genus *Bacillus* yaitu 3.4 Unit/mL. Rendahnya aktivitas enzim keratinase dengan semakin meningkatnya konsentrasi substrat, disebabkan karena pertumbuhan *Actinobacillus* spp. yang rendah sehingga jumlah bakteri *Actinobacillus* spp. yang merombak TBA masih sedikit dan produksi enzim keratinase yang dihasilkan juga rendah. Hal ini

sejalan dengan hasil penelitian Agustien *et al.* (2010) bahwa aktivitas enzim keratinase yang dihasilkan oleh *Actinobacillus* spp. termofilik menurun pada penambahan konsentrasi substrat 1.5% dengan aktivitas enzim keratinase 1.2 Unit/mL.



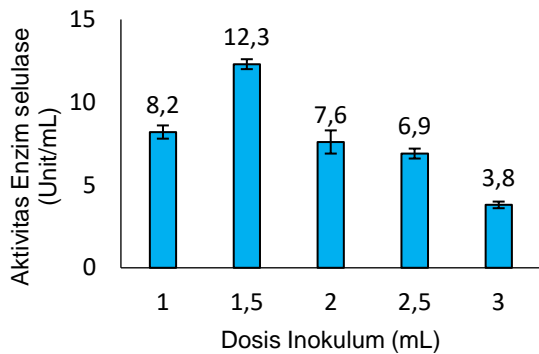
Gambar 2. Aktivitas enzim keratinase yang diproduksi oleh *Actinobacillus* spp. pada pH 9, lama fermentasi 5 hari pada konsentrasi substrat menggunakan TBA 0,5% - 2.5%.

Konsentrasi substrat adalah salah satu faktor yang penting dalam memproduksi enzim. Mazotto *et al.* (2011) mengemukakan bahwa tingginya konsentrasi tepung bulu ayam 3–5% pada medium produksi enzim akan menyebabkan penekanan produksi keratinase. Hal ini berkaitan dengan tingginya kandungan asam amino yang terdapat pada medium yang memproduksi enzim keratinase menyebabkan terjadinya represi terhadap biosintesis enzim proteolitik, sehingga menyebabkan penurunan aktivitas enzim ketika penambahan konsentrasi substrat (Zang *et al.*, 2009).

Dosis Inokulum Optimum

Hasil penelitian dapat dilihat pada Gambar 3, aktivitas enzim keratinase optimum pada dosis inokulum 1.5 mL sedangkan pada dosis inokulum di atas 1.5 mL, aktivitas enzim keratinase rendah. Rendahnya aktivitas enzim keratinase dengan meningkatnya dosis inokulum disebabkan adanya persaingan pertumbuhan sesama bakteri dalam medium fermentasi, sehingga produksi enzim keratinase oleh *Actinobacillus* spp. akan mengalami gangguan dan menurun. Menurut Shafee *et al.* (2005) dosis inokulum yang lebih besar dapat mengakibatkan oksigen terlarut menjadi berkurang dan terjadinya peningkatan kompetisi akan nutrisi. Agustien *et al.* (2010) menemukan bahwa aktivitas enzim keratinase oleh *Actinobacillus* spp. termofilik menurun

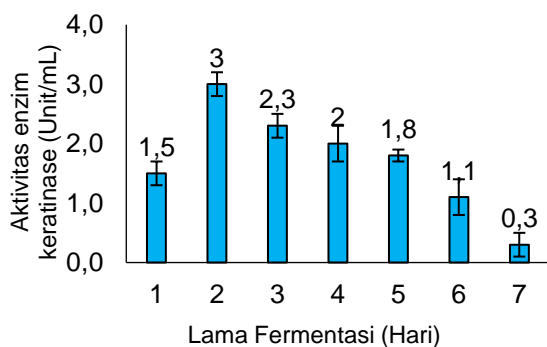
pada dosis inokulum 2.5 mL dengan aktivitas enzim 2 Unit/mL.



Gambar 3. Aktivitas enzim keratinase yang diproduksi oleh *Actinobacillus* spp. pada pH 9, lama fermentasi 5 hari menggunakan TBA 1% dengan dosis inokulum yang berbeda (1 mL – 3 mL).

Lama Fermentasi Optimum

Pada Gambar 4 dapat dilihat bahwa lama fermentasi optimum produksi enzim keratinase oleh *Actinobacillus* spp. yang difermentasikan pada media cair optimum pada hari ke 2. Sama halnya dengan yang ditemukan oleh Suharti *et al.* (2017) aktivitas enzim keratinase tertinggi yang diproduksi oleh *Bacillus* spp. adalah 8.7 unit/mL pada hari ke 2 fermentasi. Hasil ini berbeda dengan yang ditemukan oleh Agustien *et al.* (2010) bahwa aktivitas enzim keratinase yang diproduksi oleh *Actinobacillus* spp. termofilik optimum selama 32 jam.



Gambar 4. Aktivitas enzim keratinase oleh *Actinobacillus* spp. pada pH 9 dengan dosis inokulum 1.5 mL, substrat TBA 1% dengan lama fermentasi 1 hari – 7 hari.

Cepat lambatnya waktu fermentasi sangat menentukan jumlah enzim yang dihasilkan. Semakin lama waktu fermentasi maka produksi enzim yang dihasilkan semakin

tinggi, namun produksi enzim setelah waktu optimum akan mengalami penurunan, karena jumlah mikroba yang memproduksi enzim sudah mulai berkurang dan ketersediaan substrat sebagai sumber karbon dan nitrogen didalam medium fermentasi sudah mulai habis (Mazotto *et al.*, 2011).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa kondisi optimum fermentasi tepung bulu ayam oleh *Actinobacillus* spp. yang memproduksi enzim keratinase adalah pH 9, konsentrasi substrat 1%, dosis inokulum 1.5 mL, dan lama fermentasi 2 hari.

DAFTAR PUSTAKA

- Agustien, A., Nurhajati, J., Udin, L.Z. dan Aditiawati, P. (2010). Produk protease alkali dan keratinase dari mikroba termofilik. *Journal Ris. Kim.* 4(1): 7-14.
- Cheng, SW., Hue, HM., Shen, SW., Takagi, H., Asano, M., and Tsai, YC. (1995). Production and characterization of keratinase of a feather degrading *Bacillus licheniformis* PWD-1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59:2239-2243.
- Dwidjoseputro, D. (2003). Dasar – dasar mikrobiologi, Jakarta: Djambatan.
- Ignatova, Z., Geosterova, A., Spassov, G. and Nedkov, P. (1999). Isolation from the wool degrading thermophilic *actynomyces candidus*. *Microbiol. Rev, Can. Microbiol.* 45(3): 217-222.
- Mazotto, AM., Coelho, RRR., Cedrola, SML., de Lima, MF., Couri, S., de Souza, EP. and Vermelho, AB. (2011). Keratinase production by three *Bacillus* spp. using feather eal and whole feather as substrate in a submerged fermentation. *Enzyme Research:* 1-7.
- Marzuki, RA. (2015). Optimasi produksi keratinase oleh bakteri *Bacillus* SLII-I dalam medium limbah bulu ayam. Institute Teknologi Sepuluh Maret. Surabaya.

- Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell V.W. 2006. Biokimia. Harper. Edisi 25. Jakarta.
- Riffel, A. and Brandelli, A.(2006). Keratinolytic bacteria isolated from feather waste. *Brazilian Journal of Microbiology*37:395-399.
- Sinoy, TES., Bhausahab, CP. and Rajendra, PP. (2011). Isolation and identification of feather degradable microorganism. *Letter in Bioinformatics and Biotechnology* 2:128-136.
- Siswanto, S. dan Yoharmus, S. (2009). Penggunaan enzim protease pada pengolahan lateks pekat DPNR sebagai Bahan Pembuatan Sphymomanometer. *E-Journal Menara Perkebunan*, 77(2): 67-68.
- Suntornsuk, W., Tongjun, J., Onnim, P., Oyama, H., Ratanakanokchai, K. Kusamran, T. and Oda, K.(2005). Purification and characterization of keratinase from a thermotolerant feather degrading bacterium. *World Journal Microbiol Biotechnology* 21(6):1111-1117.
- Suharti, Dewantari, AA. dan Lisdiyarni, N. (2017). Pemekatan keratinase dari *Bacillus* sp. 24 untuk meningkatkan aktivitas dehairing. *Jurnal Cis-Trans (JC-T)* 1(2): 1-8.
- Zang, B., Sun.. ZW., Jiang, D. and Niu, T.(2009). Isolation dan purification of alkaline keratinase from *Bacillus* sp. 50-3. *African Journal of Biotechnology* 8(11):2598-2603.