

PRODUKSI ENZIM PROTEASE DARI LIMBAH HASIL PERIKANAN DAN PEMANFAATANNYA: KAJIAN PUSTAKA

SKRIPSI

Oleh:

NAHUM PRASETYO
NIM. 175080307111029



PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2021



**PRODUKSI ENZIM PROTEASE DARI LIMBAH HASIL PERIKANAN DAN
PEMANFAATANNYA: KAJIAN PUSTAKA**

SKRIPSI

**Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Meraih Gelar Sarjana Perikanan
di Fakultas Perikanan Dan Ilmu Kelautan
Universitas Brawijaya**

Oleh:

**NAHUM PRASETYO
NIM. 175080307111029**



**PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2021**



SKRIPSI

PROSES PEMBUATAN ENZIM PROTEASE DARI LIMBAH HASIL PERIKANAN DAN PEMANFAATANNYA: KAJIAN PUSTAKA

Oleh:

NAHUM PRASETYO

NIM. 175080307111029

Telah dipertahankan di depan penguji
pada tanggal 10 Juni 2021
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Mengetahui,
Ketua Jurusan
Manajemen Sumberdaya Perairan

Menyetujui,
Dosen Pembimbing



Dr. Ir. Muhamad Firdaus, MP
NIP. 19680919 200501 1001
Tanggal: 6/24/2021

Dr.Sc. Asep Awaludin Prihanto, S.Pi, MP
NIP. 19810602 200604 1001
Tanggal: 6/24/2021



PERNYATAAN ORISINALITAS

Dengan ini Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Nahum Prasetyo

NIM : 175080307111029

Judul Skripsi : Produksi Enzim Protease Dari Limbah Hasil Perikanan dan Pemanfaatannya: Kajian Pustaka

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa penulisan Kajian Pustaka sebagai pengganti skripsi ini berdasarkan hasil kajian, analisa, pemikiran dan pemaparan asli dari saya sendiri yang berasal dari telaah berbagai sumber pustaka. Sedangkan baik untuk naskah, tabel, gambar maupun ilustrasi lainnya yang tercantum sebagai bagian dari skripsi ini yang berasal dari sumber pustaka atau dari karya/ pendapat/ penelitian dari orang lain, maka saya telah mencantumkan sumber yang jelas dalam daftar pustaka.

Demikian pernyataan ini saya buat, apabila di kemudian hari terdapat penyimpangan dan ketidakbenaran dalam pernyataan ini, maka saya bersedia menerima sanksi akademik sesuai dengan peraturan yang berlaku di Universitas Brawijaya, Malang. Demikian pernyataan ini saya buat dalam keadaan sadar tanpa adanya paksaan dari pihak manapun.

Kediri,

Nahum Prasetyo

NIM. 175080307111029

IDENTITAS TIM PENGUJI

Judul : Produksi Enzim Protease Dari Limbah Hasil Perikanan dan Pemanfaatannya: Kajian Pustaka

Nama Mahasiswa : Nahum Prasetyo

NIM : 175080307111029

Program Studi : Teknologi Hasil Perikanan

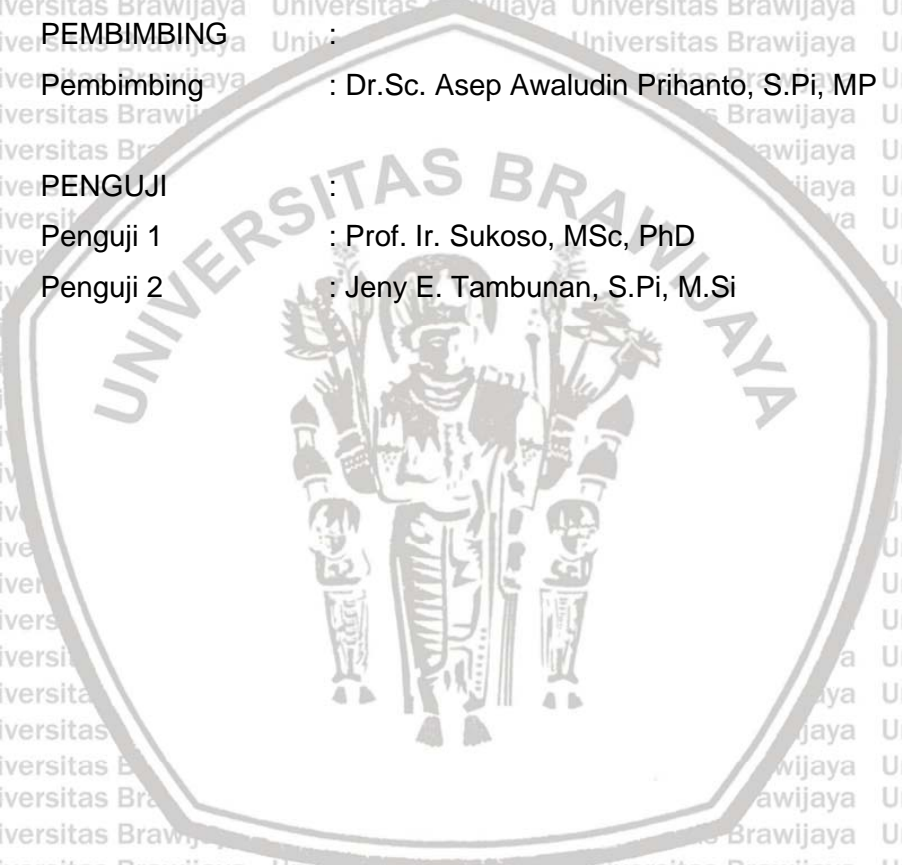
PEMBIMBING

Pembimbing : Dr.Sc. Asep Awaludin Prihanto, S.Pi, MP

PENGUJI

Penguji 1 : Prof. Ir. Sukoso, MSc, PhD

Penguji 2 : Jeny E. Tambunan, S.Pi, M.Si



RINGKASAN

NAHUM PRASETYO. Produksi Enzim Protease Dari Limbah Hasil Perikanan dan Pemanfaatannya: Kajian Pustaka (di bawah bimbingan **Dr.Sc. Asep Awaludin Prihanto, S.Pi, MP**)

Limbah hasil perikanan merupakan salah satu permasalahan yang terjadi pada negara dengan kekayaan perikanan yang cukup tinggi. Sebagai upaya penanganan limbah hasil perikanan, dapat dilakukan pemanfaatan dengan menjadikan limbah hasil perikanan sebagai bahan dari enzim protease. Enzim protease merupakan enzim dengan tingkat penjualan hingga 60% di dunia. Enzim protease dapat dimanfaatkan kegunaannya dalam berbagai bidang.

Kajian pustaka merupakan peninjauan kembali pustaka-pustaka yang terkait Langkah kajian pustaka yang dilakukan dimulai dengan penentuan topik kajian pustaka, pencarian pustaka, analisis pustaka dan penulisan kajian pustaka.

Hasil dari kajian pustaka didapatkan bahwa limbah merupakan suatu benda yang berasal dari hasil buangan dari beberapa proses yang dilakukan. Pada umumnya limbah ini berbentuk gas, cair dan padat. Enzim protease merupakan enzim yang hampir dimiliki oleh seluruh makhluk hidup. Pada spesies ikan, enzim protease dapat ditemukan pada kulit, otot, namun yang paling banyak ditemukan pada saluran pencernaan. Enzim protease sendiri, diklasifikasikan menjadi dua jenis yaitu eksopeptidase dan endopeptidase. Enzim protease memiliki aktivitas enzim yang berpengaruh pada pH, suhu, inhibitor dan pengaruh ion logam selain itu juga memiliki berat molekul enzim. Dalam menghasilkan enzim protease, dilakukan tahap ekstraksi dan tahap purifikasi. Pada tahap ekstraksi dilakukan untuk menghasilkan ekstrak kasar dari enzim, sedangkan tahap purifikasi dilakukan untuk menghasilkan enzim dengan aktivitas spesifik lebih tinggi dan nilai *yield* yang lebih baik daripada ekstrak kasar. Didapatkan beberapa referensi enzim protease yang dihasilkan dari limbah hasil perikanan. Sebagian besar, dihasilkan pada saluran pencernaan (jeroan). Hal ini disebabkan karena proses pencernaan pada ikan berjalan melalui mulut dan langsung menuju pada saluran pencernaan. Enzim protease yang dihasilkan dari limbah hasil perikanan dilakukan ekstraksi dan purifikasi. Tahap purifikasi yang dilakukan juga bervariasi yaitu semi purifikasi dan parsial purifikasi. Dari hasil uji aktivitas protease dari limbah hasil perikanan, didapatkan hasil purifikasi terbaik menggunakan jenis semi purifikasi yang melalui metode presipitasi, dialisis dan kromatografi penukar ion. Aktivitas enzim protease dari limbah hasil perikanan berdasarkan suhu dan pH juga bervariasi berdasarkan jenis protease yang dihasilkan. Selain itu, senyawa inhibitor yang dominan dalam menghambat aktivitas enzim protease dari limbah hasil perikanan adalah senyawa PMSF. Pengaruh ion logam terhadap enzim protease dari limbah hasil perikanan dapat berperan sebagai inhibitor maupun aktivator. Enzim protease dari limbah hasil perikanan dapat dimanfaatkan sebagai bahan hidrolisat protein, bahan *deharing* pada industri kulit dan bahan *destaining* pada sabun deterjen.

Limbah hasil perikanan mampu dimanfaatkan sebagai bahan penghasil enzim protease. Akan tetapi, jika dilihat dari nilai ekonomis pemanfaatan limbah hasil perikanan tidak menunjukkan sisi yang ekonomis dibanding penghasil enzim protease yang lain seperti tanaman.



DAFTAR ISI

Halaman

PERNYATAAN ORISINALITAS..... iv

IDENTITAS TIM PENGUJI..... v

UCAPAN TERIMA KASIH..... vi

RINGKASAN..... vii

KATA PENGANTAR..... viii

DAFTAR ISI..... ix

DAFTAR TABEL..... xi

DAFTAR GAMBAR..... xii

DAFTAR LAMPIRAN..... xiii

1. PENDAHULUAN..... 14

1.1 Latar Belakang..... 14

1.2 Tujuan..... 16

2. METODE KAJIAN PUSTAKA..... 17

2.1 Kajian Pustaka..... 17

2.2 Tahapan Pembuatan Kajian Pustaka..... 17

2.3 Kerangka Kajian Pustaka..... 21

3. HASIL KAJIAN PUSTAKA..... 22

3.1 Pengertian Limbah..... 22

3.2 Limbah Hasil Perikanan..... 23

3.2.1 Ketersediaan Limbah Hasil Perikanan..... 23

3.2.2 Kandungan Limbah Hasil Perikanan..... 24

3.3 Enzim Protease..... 25

3.3.2 Klasifikasi Enzim Protease..... 25

3.3.1 Sumber Enzim Protease..... 28

3.3.3 Berat Molekul, Pengaruh pH dan Suhu Terhadap Aktivitas Enzim Protease..... 31

3.3.4 Pengaruh Senyawa Inhibitor Terhadap Aktivitas Enzim Protease..... 32

3.3.5 Pengaruh Ion Logam Terhadap Aktivitas Enzim Protease..... 32

3.4 Ekstraksi dan Purifikasi Enzim Protease..... 34

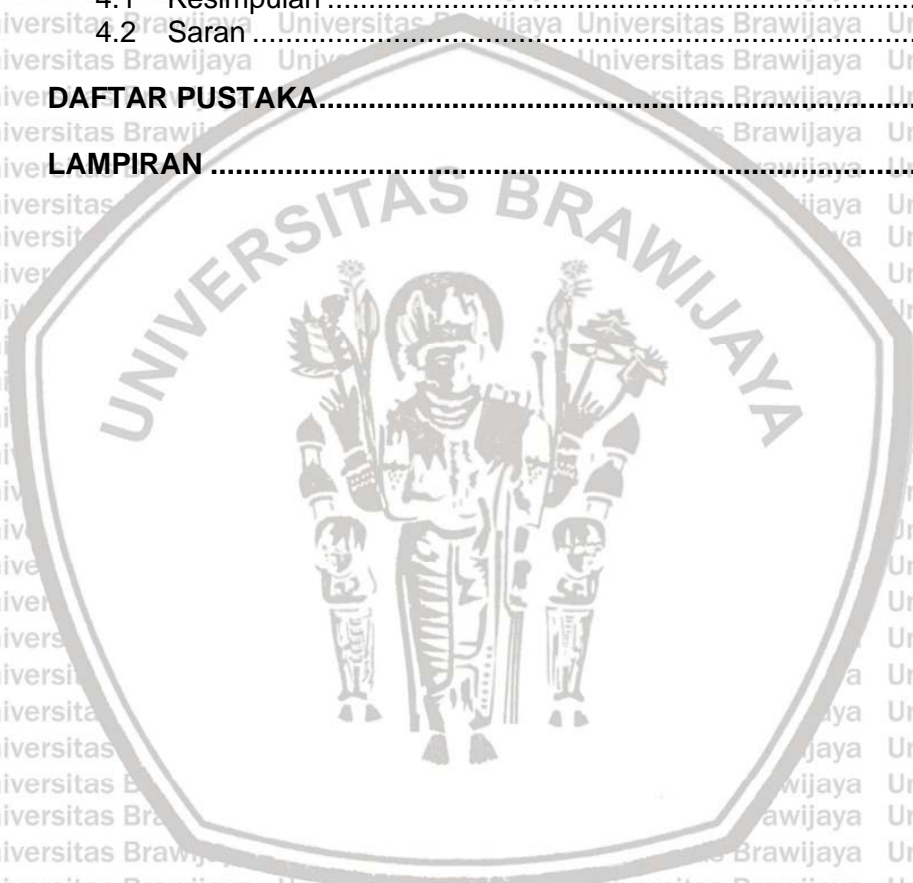
3.4.1 Ekstraksi Enzim Protease..... 34

3.4.2 Purifikasi Enzim Protease..... 36

3.4.3 Perhitungan Aktivitas Enzim Protease..... 44

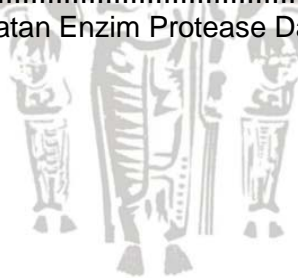


3.5	Enzim Protease dari Limbah Hasil Perikanan.....	48
3.5.1	Ekstraksi Enzim Protease dari Limbah Hasil Perikanan.....	50
3.5.2	Purifikasi Enzim Protease dari Limbah Hasil Perikanan.....	52
3.5.3	Berat Molekul, Pengaruh Suhu dan pH Terhadap Aktivitas Enzim Protease dari Limbah Hasil Perikanan.....	56
3.5.4	Pengaruh Inhibitor Terhadap Aktivitas Enzim Protease Dari Limbah Hasil Perikanan.....	58
3.5.5	Pengaruh Ion Logam Terhadap Aktivitas Enzim Protease Dari Limbah Hasil Perikanan.....	59
3.6	Pemanfaatan Enzim Protease Dari Limbah Hasil Perikanan.....	61
4.	PENUTUP	63
4.1	Kesimpulan.....	63
4.2	Saran.....	63
	DAFTAR PUSTAKA.....	64
	LAMPIRAN	73



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
Tabel 1. Kata Kunci Pencarian Pustaka	19
Tabel 2. Kandungan Protein Limbah Hasil Perikanan.....	25
Tabel 3. Klasifikasi Enzim Protease	27
Tabel 4. Sumber Enzim Protease.....	29
Tabel 5. Berat Molekul, Pengaruh pH dan Suhu Terhadap Aktivitas Enzim Protease	31
Tabel 6. Pengaruh Senyawa Inhibitor Terhadap Aktivitas Enzim Protease.....	32
Tabel 7. Pengaruh Ion Logam Terhadap Aktivitas Enzim Protease	33
Tabel 8. Ekstraksi Enzim Protease.....	35
Tabel 9. Purifikasi Enzim Protease.....	40
Tabel 10. Tabel <i>Summary of Purification</i>	43
Tabel 11. Enzim Protease dari Limbah Hasil Perikanan.....	49
Tabel 12. Ekstraksi Enzim Protease dari Limbah Hasil Perikanan.....	51
Tabel 13. Purifikasi Enzim Protease dari Limbah Hasil Perikanan.....	52
Tabel 14. Tabel <i>Summary of Purification</i> Enzim Protease dari Limbah Hasil Perikanan	54
Tabel 15. Berat Molekul, Pengaruh Suhu dan pH Terhadap Aktivitas Enzim Protease dari Limbah Hasil Perikanan.....	56
Tabel 16. Pengaruh Senyawa Inhibitor Terhadap Aktivitas Enzim Protease dari Limbah Hasil Perikanan.....	59
Tabel 17. Pengaruh Ion Logam Terhadap Aktivitas Enzim Protease Dari Limbah Hasil Perikanan	59
Tabel 18. Pemanfaatan Enzim Protease Dari Limbah Hasil Perikanan	62



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
Gambar 1. Tahapan Pembuatan Kajian Pustaka	17
Gambar 2. Klasifikasi Enzim Protease (Hamza, 2017)	26
Gambar 3. Sumber Enzim Protease	29
Gambar 4. a) Saluran Pencernaan (<i>Scomberomorus Guttatus</i>) (Rengasmy <i>et al.</i> , 2016); b) Jaringan Otot (<i>Trachurus japonicas</i>) (Yoshida <i>et al.</i> , 2015) c) Kulit (<i>Alutherus monoceros</i>) (Ahmad <i>et al.</i> , 2011)	30
Gambar 5. Hasil Analisis Berat Molekul Enzim Protease (Mander <i>et al.</i> , 2015)	45
Gambar 6. Hasil Analisis Aktivitas Enzim Protease Terhadap pH (Mander <i>et al.</i> , 2015)	46
Gambar 7. Hasil Analisis Enzim Protease Terhadap Suhu (Mander <i>et al.</i> , 2015)	47
Gambar 8. Aktivitas Inhibitor Enzim Protease (Saranya <i>et al.</i> , 2018)	48



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Kerangka

Halaman

73



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia yang dikenal negara kepulauan terbesar didunia, memiliki berbagai macam sumberdaya perikanan yang cukup tinggi. Salah satu sumberdaya perikanan yaitu ikan. Produksi ikan di Indonesia mencapai angka hingga 38,39 kg/kap/th dan meningkat di tahun 2014 mencapai angka hingga 51,8 kg/kap/th dengan tingkat pertumbuhan sebesar 7,85% (Djunaidah, 2017). Dengan besarnya angka produksi ikan di Indonesia, tentunya berbanding lurus dengan tingkat konsumsi ikan di Indonesia yang tinggi. Menurut Kementerian Kelautan dan Perikanan (2018), konsumsi ikan dari tahun 2014 – tahun 2017 mengalami peningkatan. Pada tahun 2017 dengan angka konsumsi ikan tertinggi mencapai 46,49 kg/kap/th.

Salah satu permasalahan yang dihadapi dengan tingginya angka konsumsi ikan di Indonesia yaitu terdapat pada hasil samping yang berupa limbah hasil perikanan. Limbah hasil dari sektor kelautan dan perikanan pada umumnya menghasilkan limbah padat, seperti tulang, karapas, kulit dan kepala ikan (Luhur *et al.*, 2016). Limbah hasil limbah hasil perikanan umumnya terdiri dari berbagai sumber seperti hasil tangkapan, hasil proses dan sebagainya. Hampir 50% sisa material dari total dalam proses produk perikanan tidak digunakan sebagai produk akhir dan mengakibatkan sampah atau limbah yang mencapai 32 juta ton (Arvanitoyannis dan Kassaveti, 2011). Akan tetapi, limbah hasil perikanan memiliki banyak potensi berupa protein yang dapat diolah secara kimiawi maupun biologi untuk menghasilkan produk yang lebih bermanfaat dan bernilai ekonomis (Agung *et al.*, 2011).

Limbah hasil perikanan berpotensi menghasilkan nilai ekonomis yang tinggi apabila dapat diolah kembali dengan cara yang tepat. Protein dan asam amino yang terkandung dalam limbah hasil perikanan tergolong tinggi. Secara umum, limbah hasil perikanan mengandung beberapa unsur seperti Nitrogen, Fosfor, Kalium dan lainnya. Salah satu pemanfaatan limbah hasil perikanan yang dapat dilakukan yaitu menjadikan limbah hasil perikanan sebagai bahan penghasil enzim protease (Suptijah, 2010).

Berkembangnya inovasi tentang pengaplikasian enzim khususnya protease, menjadikan enzim protease memiliki peran yang sangat penting dalam berbagai bidang industri. Protease merupakan enzim proteolitik yang bekerja mengkatalis pemutusan ikatan peptida pada protein (Pamaya *et al.*, 2018). Enzim protease merupakan salah satu enzim skala industri dengan tingkat penjualan hingga 60% dari total penjualan enzim di dunia (Yuniati *et al.*, 2015).

Protease secara fisiologi diperlukan untuk hampir semua makhluk hidup, oleh karena itu protease dapat ditemukan di berbagai sumber seperti tumbuhan, hewan dan mikroorganisme. Dari berbagai sumber enzim protease, setiap sumber tentunya memiliki keunggulan dan kekurangan dalam menghasilkan enzim protease itu sendiri (Hamza, 2017). Enzim protease dapat ditemukan pada beberapa sumber seperti tanaman, mikroba dan hewan. Tanaman sebagai penghasil enzim protease sebesar 40,35% dan mikroba sebagai penghasil enzim protease sebesar 18,09%. Sedangkan hewan sebagai penghasil enzim protease sebesar 11,5% (Fathimah dan Wardani, 2014).

Sebagai enzim dengan tingkat penjualan hingga 60% di dunia, enzim protease tentunya memiliki banyak kegunaan dalam berbagai bidang. Protease yang merupakan jenis enzim hidrolase banyak dimanfaatkan pada berbagai bidang industri seperti industri pangan (Elfian *et al.*, 2017). Selain pada industri pangan, enzim protease juga dapat dimanfaatkan sebagai deterjen, pembuatan

kulit dan juga industri pangan dan pertanian (Pant *et al.*, 2015). Dengan kemajuan dalam bidang bioteknologi memungkinkan semakin meluasnya penggunaan enzim protease dalam berbagai produk komersial (Ramadhani *et al.*, 2015).

1.2 Tujuan

Tujuan dari kajian pustaka ini bertujuan memberikan informasi terkait proses produksi enzim protease dari limbah hasil perikanan dan pemanfaatannya.



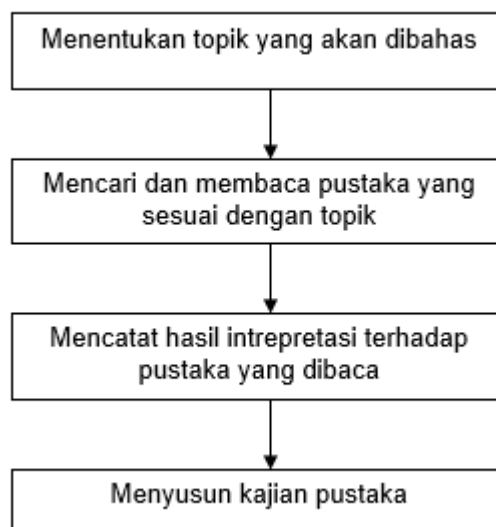
2. METODE KAJIAN PUSTAKA

2.1 Kajian Pustaka

Kajian pustaka merupakan kegiatan peninjauan kembali pustaka-pustaka yang terkait (*review of related literature*). Tujuan dari kajian pustaka yaitu pengumpulan data dan informasi ilmiah yang berkembang yang terdapat dalam berbagai sumber (Prastowo, 2012). Untuk melakukan kajian pustaka dibutuhkan keahlian dalam menemukan pustaka yang sesuai, menangkap isi informasi dari pustaka dan menuangkan dalam penulisan kajian pustaka yang dapat menarik perhatian pembaca (Pautasso, 2013).

2.2 Tahapan Pembuatan Kajian Pustaka

Penyusunan kajian pustaka dilakukan dengan beberapa tahapan yang dikerjakan. Dalam menyusun kajian pustaka, penulis menggunakan kajian pustaka menurut Prastowo (2012), yang dapat dilihat pada **Gambar 1**.



Gambar 1. Tahapan Pembuatan Kajian Pustaka

2.2.1 Penentuan Topik Kajian Pustaka

Pengertian dari topik menurut Silaswati (2018), adalah langkah awal yang dilakukan dalam penyusunan kajian pustaka. Topik merupakan ide utama yang dipilih penulis yang merupakan pokok dari kajian pustaka yang ditulis. Ada beberapa tahap yang dapat digunakan sebagai sumber penentuan topik, sebagai berikut:

1. Topik harus bermanfaat dan layak dibahas.
2. Topik dikenal baik dan dikuasai atau diketahui penulis.
3. Topik cukup menarik.
4. Ketersediaan pustaka sebagai informasi penunjang memadai.
5. Topik yang dipilih membahas dengan secara umum.

Topik yang digunakan penulis dalam kajian pustaka ini yaitu produksi enzim protease dari limbah hasil perikanan dan pemanfaatannya. Topik tersebut dipilih karena limbah hasil perikanan mampu menjadi substitusi penghasil enzim protease. Enzim protease merupakan enzim dengan tingkat penjualan 60% di dunia dengan bahan baku limbah hasil perikanan yang memiliki nilai yang rendah.

Atas beberapa pertimbangan tersebut penulis memilih topik produksi enzim protease dari limbah hasil perikanan dan pemanfaatannya sebagai kajian utama dalam kajian pustaka ini.

2.2.2 Pencarian Pustaka

Dalam pencarian pustaka menurut Sutrisno (2016), dilakukan setelah tahap penentuan topik. Pencarian pustaka dilakukan dengan mencari pustaka yang akan membantu dalam penyusunan suatu kajian pustaka. Suatu kajian pustaka yang terperinci, biasanya diperlukan oleh mahasiswa dalam melaksanakan tugas akhir. Sebuah pustaka akan menjadi acuan bagi penulis

dalam mengembangkan pikiran dan isi dari kajian pustaka. Beberapa jenis referensi atau pustaka, sebagai berikut:

1. Pustaka sebagai referensi.
2. Pustaka sebagai sumber utama.
3. Pustaka sebagai sumber sekunder.

Pencarian artikel yang dilakukan penulis yaitu mengandalkan pustaka secara daring. Pustaka yang dianalisis berasal dari hasil pencarian menggunakan beberapa mesin pencari dari basis data utama dengan beberapa kata kunci. Basis

data yang digunakan adalah *Google Scholar, Neliti, Researchgate, Proquest, Elsevier Science Direct, Spinger*. Hasil pencarian tersebut dibatasi dengan minimal tahun terbit kurang dari sepuluh tahun terakhir dengan persentase setidaknya 60%

dari total sumber pustaka. Selain itu, pencarian juga dibatasi dengan wilayah penelitian indonesia sebesar 40% dan internasional 60%. Jumlah minimum pustaka yang digunakan yaitu 20 pustaka. Kategori *scopus* dari jurnal yang

digunakan yaitu Q1-Q4. Pencarian kategori *scopus* jurnal dilakukan secara online melalui <https://www.scimagojr.com/>. Kata kunci beserta *database* yang digunakan dapat dilihat pada **Tabel 1**.

Tabel 1. Kata Kunci Pencarian Pustaka

No.	Kata Kunci
1.	Protease
2.	<i>Protease enzyme</i>
3.	<i>Protease enzyme function</i>
4.	<i>Fish waste</i>
5.	<i>Fish waste nutrition</i>
6.	<i>Protease enzyme from fish waste</i>

2.2.3 Analisis Pustaka

Menganalisis sumber pustaka yang didapat perlu dilakukan agar peneliti dapat atau mampu memahami isi dari sumber pustaka. Salah satu cara dalam

menganalisis sumber pustaka yaitu dengan membaca pustaka dengan teliti dilakukan pencatatan pokok pustaka yang agak digunakan sebagai data dalam penulisan kajian pustaka. Dalam menganalisis sumber pustaka diperlukan ketekunan yang tinggi agar data dan analisis data serta kesimpulan yang dihasilkan sesuai dengan tujuan yang diharapkan. Selain itu, juga diperlukan analisis yang matang dan mendalam dalam menganalisis sumber pustaka (Melfianora, 2019).

Analisis pustaka yang dilakukan oleh penulis dilakukan dengan membaca pustaka yang didapatkan dengan seksama. Pembacaan artikel dilakukan lebih dari sekali untuk mendapatkan informasi yang ingin didapatkan. Setelah itu, informasi yang didapatkan ditabulasi dalam tabel agar mudah dalam tahap penulisan kajian pustaka. Analisis pustaka perlu dilakukan secara mendalam agar mendapatkan isi dari pustaka secara terinci.

2.2.4 Penulisan Kajian Pustaka

Dalam penulisan studi literatur menurut Knudsen *et al.* (2012), haruslah memenuhi kaidah penulisan yang telah ditetapkan. Umumnya format penulisan berisi antara lain: judul, abstrak, pendahuluan, metode penelitian, hasil, kesimpulan serta daftar pustaka. Proses penulisan dapat dilakukan dalam empat tahap, sebagai berikut:

1. *Brainstorming*, proses ini umumnya disebut dengan *pre-writing* merupakan pencatatan ide-ide diatas kertas.
2. *Drafting*, proses ini dimulai dengan melengkapi kalimat secara utuh, paragraf dan sub topik yang dilakukan saat proses sebelumnya.
3. *Revising*, membuat tulisan yang baik melalui revisi.
4. *Editing*

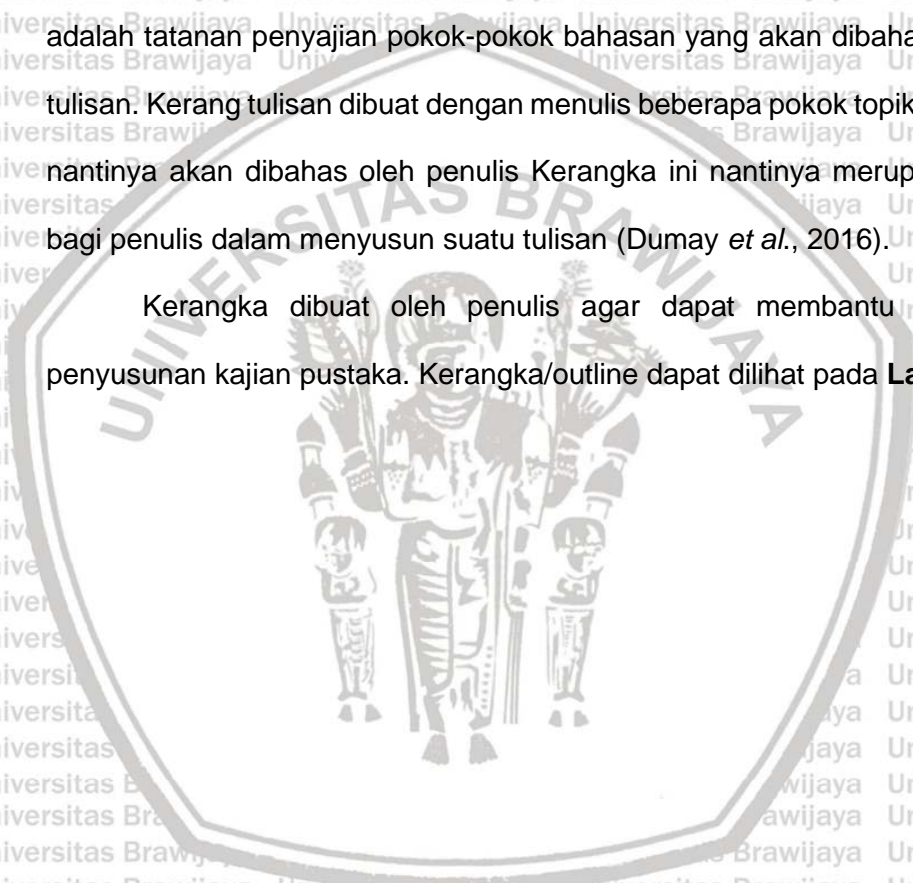
Penulisan kajian pustaka dilakukan dengan mengumpulkan hasil dari analisis pustaka yang dilakukan ke dalam suatu narasi. Susunan kajian pustaka

dibuat secara berurutan berawal dari topik umum hingga topik khusus yang dibahas. Selain itu, penulis juga memberikan argumen atau kesimpulan dari korelasi tiap pustaka yang didapatkan. Penulis kajian pustaka juga dilakukan sesuai pedoman penulisan dari Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya.

2.3 Kerangka Kajian Pustaka

Kerangka tulisan, juga disebut *outline*, ragangan atau kerangka karangan adalah tatanan penyajian pokok-pokok bahasan yang akan dibahas dalam suatu tulisan. Kerang tulisan dibuat dengan menulis beberapa pokok topik bahasan yang nantinya akan dibahas oleh penulis Kerangka ini nantinya merupakan panduan bagi penulis dalam menyusun suatu tulisan (Dumay *et al.*, 2016).

Kerangka dibuat oleh penulis agar dapat membantu dalam proses penyusunan kajian pustaka. Kerangka/outline dapat dilihat pada **Lampiran 1**



3. HASIL KAJIAN PUSTAKA

3.1 Pengertian Limbah

Limbah merupakan suatu benda yang berasal dari hasil buangan dari beberapa proses yang dilakukan. Pada umumnya limbah ini berbentuk gas, cair dan padat (Rizal, 2011). Terjadinya buangan limbah sendiri menurut FAO (2011), dapat disebabkan beberapa hal seperti berikut:

1. Kurangnya fasilitas penyimpanan.
2. Kurangnya infrastruktur dan transportasi.
3. Fasilitas pasar yang kurang memadai.
4. Kurangnya sistem pengemasan.

Limbah hasil perikanan sendiri dapat dikelompokkan dari beberapa jenis seperti: limbah ikan yang berasal dari hasil penangkapan non target, limbah ikan yang berasal dari sisa pengolahan meliputi jeroan; kepala; kulit; tulang; sirip, limbah ikan yang berasal akibat surplus penangkapan ikan dan limbah ikan yang berasal selama pendistribusian ikan (Fadhil *et al.*, 2017). Diperkirakan hampir 50% dari total penangkapan ikan tidak dapat digunakan sebagai makanan (Mo *et al.*, 2018). Limbah yang dihasilkan selama pendistribusian ikan dihasilkan karena dalam proses pendistribusian ikan, ikan mengalami kebusukan akibat penanganan yang kurang baik (Mo *et al.*, 2018).

Di beberapa negara berkembang, dampak dari limbah hasil perikanan sangatlah tinggi dan menjadi masalah yang serius. Limbah hasil perikanan itu berasal dari hasil pengolahan perikanan yang diperoleh sebesar 70% dari bahan baku. Sehingga dapat berpotensi mencemari lingkungan jika tidak dapat dimanfaatkan dengan cara yang baik (Ahuja *et al.*, 2020).

3.2 Limbah Hasil Perikanan

Istilah 'limbah ikan' dapat mencakup bahan yang berbeda seperti ikan utuh (ikan mati atau rusak) dan jaringan khusus, seperti kepala, usus, ekor dan sirip, kulit, sisik, dan tulang dan lain-lain. Limbah hasil perikanan juga menggunakan istilah yang berbeda, misalnya limbah ikan, limbah pengolahan ikan, produk sampingan, bahan mentah atau sisa bahan mentah (Choe *et al.*, 2020). Industri pengolahan ikan merupakan salah satu penghasil sampah yang tidak signifikan karena timbulnya yang melimpah limbah terutama terdiri dari bagian tubuh ikan.

Namun, limbah ikan memiliki nilai protein tinggi yang mengandung hingga 58% bahan kering dan hanya sedikit lebih rendah dari protein dari makanan ikan komersial (Husin *et al.*, 2012). Dalam mengurangi adanya limbah hasil perikanan ini, perlu dilakukan strategi pengurangan limbah yang penting untuk industri, dimana dilakukan pemulihan produk sampingan yang dapat dipasarkan dari limbah ikan (Kafle dan Kim, 2012).

Limbah hasil perikanan dapat diolah dan dimanfaatkan menjadi bahan baru. Pemanfaatan ini dilakukan untuk mengurangi jumlah dari limbah hasil perikanan yang sangat tinggi. Limbah hasil perikanan dapat dimanfaatkan menjadi beberapa produk, salah satunya dijadikan alternatif dari bahan pembuat enzim protease. Kandungan protein yang masih tinggi dalam limbah hasil perikanan dapat memungkinkan untuk dilakukan pemanfaatan sebagai strategi dalam mengurangi limbah hasil perikanan (Kannan *et al.*, 2017).

3.2.1 Ketersediaan Limbah Hasil Perikanan

Pengolahan hasil perikanan menghasilkan sejumlah besar limbah dalam bentuk produk sampingan yang tidak dapat dimakan dengan asumsi 45% berat ikan menjadi limbah. Diperkirakan hampir 64 juta ton limbah ikan dihasilkan setiap tahun. Limbah ikan, terutama terdiri dari kepala, jeroan, tulang dan sisik. Limbah

ikan sendiri, kaya akan kandungan protein dan kandungan lemak, akan tetapi seringkali kurang dimanfaatkan (Nges *et al.*, 2012).

Diperkirakan konsumsi sumber daya perikanan mencapai 105,6 juta ton atau 75% dari produksi ikan di seluruh dunia. Sedangkan 34,8 juta ton atau 25% yang tersisa merupakan limbah (Rebah dan Miled, 2013). Limbah hasil perikanan dihasilkan tergantung pada proses pengolahan hasil perikanan yang kemungkinan besar mencapai angka 30-70% dari berat ikan (Balraj *et al.*, 2014).

Peningkatan terjadi tiap tahunnya terhadap angka konsumsi ikan di Indonesia. Data yang bersumber dari Kementerian Kelautan dan Perikanan (2018), menunjukkan bahwa angka konsumsi ikan di Indonesia pada tahun 2017 mencapai angka 46,49 kg/kap/tahun dimana mengalami kenaikan dibanding pada tahun 2016 yang mencapai angka 43,94 kg/kap/tahun. Sementara itu, angka produksi perikanan di Indonesia mencapai 23,26 juta ton pada TW IV 2017. Hal ini, mengakibatkan berbanding lurus dengan angka limbah hasil perikanan yang dihasilkan.

3.2.2 Kandungan Limbah Hasil Perikanan

Pemanfaatan limbah hasil perikanan dapat dimanfaatkan sebagai produk baru yang memiliki nilai jika dilakukan pengolahan dengan baik dan benar. Pada umumnya, limbah hasil perikanan masih memiliki kandungan nutrisi yang baik. Limbah hasil perikanan memiliki banyak kandungan unsur seperti N (Nitrogen), P (Fosfor) dan Ca (Kalium) yang merupakan unsur penyusun protein (Illera-Vives *et al.*, 2015). Pemanfaatan dan pemrosesan limbah hasil perikanan dapat dilakukan dengan diolah menjadi enzim (Ghaly *et al.*, 2013). Limbah hasil perikanan seperti jeroan ikan dapat dimanfaatkan sebagai sumber alternatif penghasil enzim protease (Pipih, 2010). Kandungan protein limbah hasil perikanan dapat dilihat pada **Tabel 2**.

Tabel 2. Kandungan Protein Limbah Hasil Perikanan

Bahan Baku	Protein (%)	Referensi
Kepala Ikan Tongkol (<i>Euthynnus affinis</i>)	19,30±0,31	Khoddami <i>et al.</i> , 2012
Usus Ikan Tongkol (<i>Euthynnus affinis</i>)	19,01±0,14	Khoddami <i>et al.</i> , 2012
Hati Ikan Tongkol (<i>Euthynnus affinis</i>)	18,06±0,68	Khoddami <i>et al.</i> , 2012
Kepala Ikan Kakak Tua (<i>Chlorurus sordidus</i>)	20,37±2,33	Prihanto <i>et al.</i> , 2019
Kulit (<i>C. catla</i>)	24,35±0,95	Mahboob, 2015
Kulit (<i>C. crigala</i>)	26,10±1,24	Mahboob, 2015
Jeroan Ikan Tuna Sirip Kuning	19,11	Pezeshk <i>et al.</i> , 2017

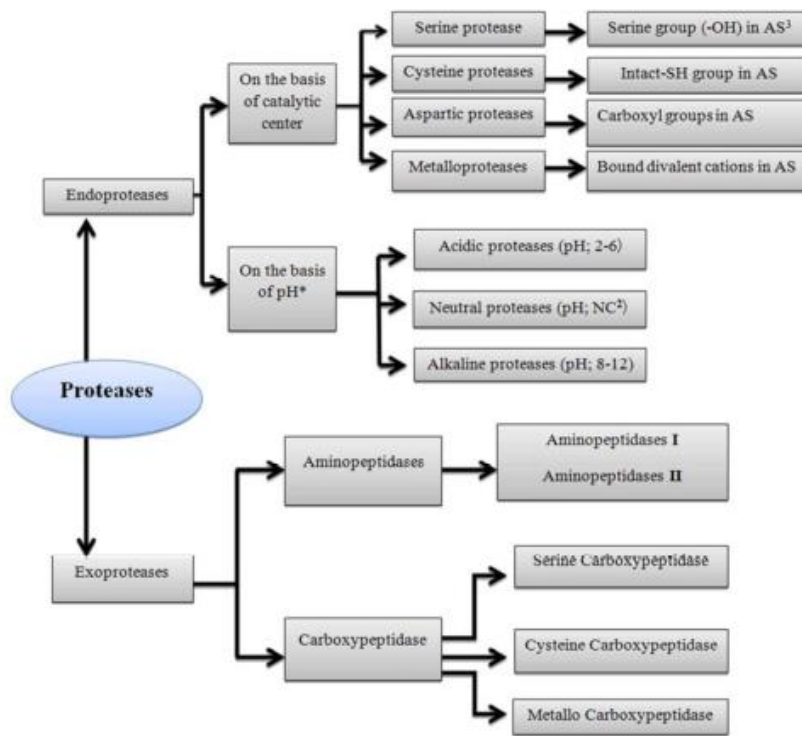
3.3 Enzim Protease

Enzim protease merupakan salah satu enzim yang berfungsi dalam pemecahan ikatan peptida pada protein. Protease adalah salah satu kelompok enzim industri yang paling penting, mewakili lebih dari 65 % pasar enzim industri global (Rebah dan Miled, 2013). Protease adalah enzim yang mampu menghidrasi peptida. Protease sendiri dapat diperoleh dari beberapa mikroorganisme, namun hasil perikanan seperti ikan juga berpotensi sebagai salah satu penghasil enzim protease (Ramkumar *et al.*, 2016).

3.3.2 Klasifikasi Enzim Protease

Berikut merupakan klasifikasi dari enzim protease yang dapat dilihat pada

Gambar 2.



Gambar 2. Klasifikasi Enzim Protease (Hamza, 2017)

Protease dapat diklasifikasikan berdasarkan sifat kimiawi dari situs aktif, reaksi yang katalis dan strukturnya atau komposisi (Hamza, 2017).

- a. Berdasarkan situs katalitik pada substrat
 1. Eksoprotease, bekerja di ujung rantai polipeptida.
 2. Endoprotease, bekerja di daerah dalam dari rantai polipeptida.
- b. Berdasarkan pusat katalitik
 1. *Serine protease*, merupakan protease yang memiliki gugus serin (-OH) di sisi aktifnya.
 2. *Cysteine protease*, merupakan protease yang memiliki aktivitas yang bergantung pada keberadaan gugus SH utuh di sisi aktifnya.
 3. *Metalloprotease*, merupakan protease yang memiliki aktivitas yang bergantung pada lebih banyaknya keberadaan dari kation divalen yang kurang terikat.

4. *Aspartic Protease*, merupakan protease yang mengandung satu atau lebih kelompok karboksil rantai samping di sisi aktifnya. Pada umumnya juga dikenal sebagai protease asam.

c. Berdasarkan nilai pH

1. Protease asam, protease asam adalah protease yang aktif pada kisaran pH 2-6.

2. Protease netral, protease netral adalah protease yang aktif pada pH netral, basa lemah atau asam lemah.

3. Protease alkali, protease alkali adalah protease yang aktif pada kisaran pH 8-12.

Klasifikasi umum enzim protease menurut Jisha *et al.* (2013), dengan kode enzim (EC) dan mekanisme kerja spesifik dari setiap sub kelompok enzim protease dapat dilihat pada **Tabel 3**.

Tabel 3. Klasifikasi Enzim Protease

No.	Jenis Protease	EC	Mekanisme Kerja
1.	Exopeptidase	3,4, 11-19	Membelah ikatan peptida di proksimal amino atau ujung karboksi
a)	Aminopeptidase	3,4,11	Bertindak sebagai N-terminal bebas untuk membebaskan asam amino tunggal
b)	Carboxypeptidase	3,4,16-18	Melepaskan residu C-terminal dari polipeptida
2.	Endopeptidase	3,4,21-24	Memisahkan ikatan dalam rantai polipeptida
a)	Serine Protease	3,4,21	Endopeptidase yang memiliki serin pusat aktif yang terlibat dalam proses katalitik
b)	Cysteine Protease	3,4,18	Endopeptidase yang memiliki sistein pusat aktif
c)	Aspartic protease	3,4,23	Endopeptidase yang memiliki residu asam aspartat untuk aktivitas katalitiknya
d)	Metalloprotease	3,4,24	Endopeptidase yang menggunakan ion logam, pada

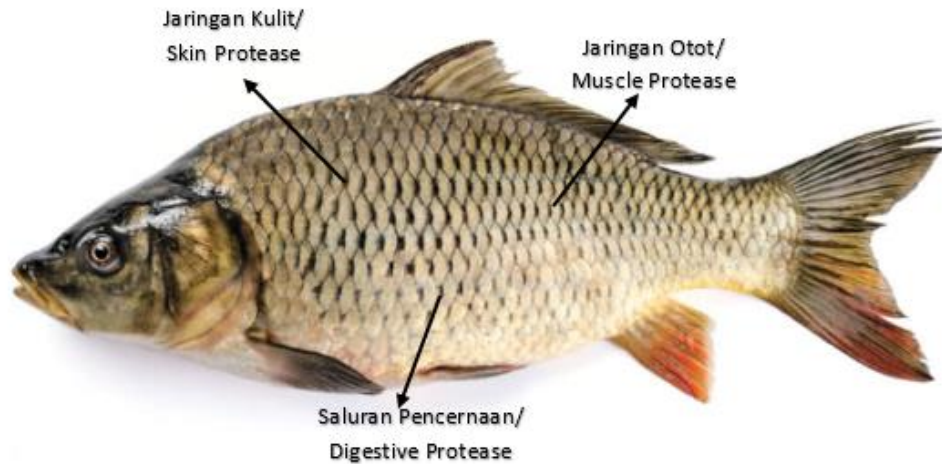
- e) Endopeptidase dari mekanisme katalitik yang tidak diketahui 3,4,99 umumnya Zn²⁺ dalam mekanisme katalitik Bertindak pada peptida

Sumber: Jisha *et al.*, 2013

3.3.1 Sumber Enzim Protease

Sumber dari enzim protease dapat ditemukan pada beberapa sumber. Hasil perikanan merupakan salah satu sumber dihasilkannya enzim protease, dari beberapa jenis ikan. Hal ini dikarenakan ikan sendiri juga menghasilkan enzim protease dalam tubuhnya. Protease pada ikan memiliki sifat molekul yang beragam, tergantung pada spesies, organ, serta faktor lingkungannya. Enzim protease dalam ikan sendiri umumnya terpusat dalam jaringan otot atau beragam organ terutama organ pencernaan. Protease tersebut memiliki berbagai bobot molekul (MW), suhu optimal, dan nilai aktivitas pH (Singh dan Benjakul, 2018).

Enzim protease menurut Syahrir *et al.* (2020), pada tubuh ikan diproduksi oleh pankreas yang bekerja mencerna protein menjadi peptida atau asam amino agar dapat diserap oleh sel eritrosit yang terdapat pada dinding sebelah dalam usus. Sel eksokrin pada pankreas bekerja menyintesis enzim protease. Jumlah enzim protease yang disalurkan ke usus tergantung pada produksi enzim protease dari pankreas. Enzim protease juga dapat dihasilkan melalui bantuan mikroba dalam saluran pencernaan. Sumber enzim protease pada tubuh ikan dapat dilihat pada **Gambar 3**.

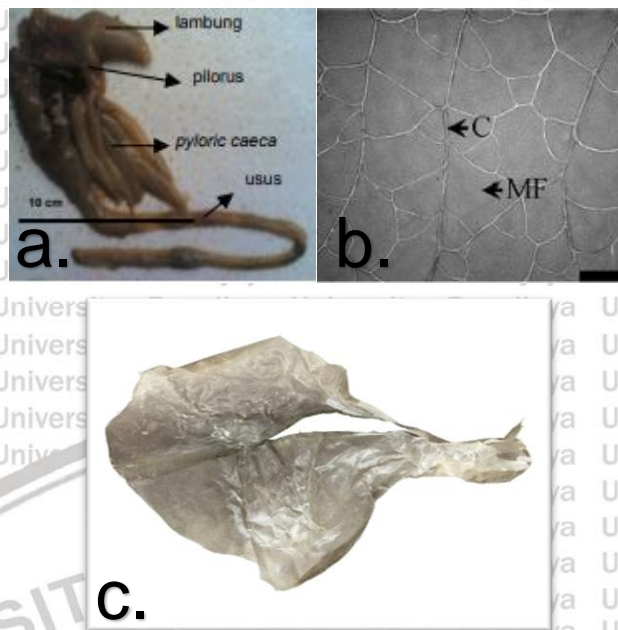


Gambar 3. Sumber Enzim Protease

Enzim protease yang bersumber dari hasil perikanan terdapat pada beberapa organ pada beberapa spesies ikan. Beberapa sumber dari enzim protease pada beberapa organ dan berbagai spesies dapat dilihat pada **Tabel 4**.

Tabel 4. Sumber Enzim Protease

Enzim	Organ	Spesies	Referensi
Digestive Protease	Hepatopancreas	Udang galah (<i>Macrobrachium rosenbergii</i>)	Sriket <i>et al.</i> , 2012
	Viscera	Udang vannamei (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	Senphan <i>et al.</i> , 2015
Goby (<i>Zosterisessor ophiocephalus</i>)		Nasri <i>et al.</i> , 2015	
<i>Sardinella aurita</i>		Khaled <i>et al.</i> , 2011	
	Intestine	Ikan Tenggiri Papan (<i>Scomberomorus guttatus</i>)	Rengasamy <i>et al.</i> , 2016
	Pyloric caeca	Pacu (<i>Colossoma macropanum</i>)	Marcuschi <i>et al.</i> , 2010
Muscle protease	Muscle	Makarel Jack Jepang (<i>Trachurus japonicas</i>)	Yoshida <i>et al.</i> , 2015
Skin protease	Skin	Unicorn leatherjacket (<i>Alutherus monoceros</i>)	Ahmad <i>et al.</i> , 2011



Gambar 4. a) Saluran Pencernaan (*Scomberomorus Guttatus*) (Rengasmy *et al.*, 2016); b) Jaringan Otot (*Trachurus japonicas*) (Yoshida *et al.*, 2015) c) Kulit (*Alutherus monoceros*) (Ahmad *et al.*, 2011).

Organ pencernaan merupakan salah satu sumber utama sebagai produksi enzim protease pada ikan dan dapat disebut sebagai *digestive protease*. Terdapat beberapa organ pencernaan yang diketahui sebagai penghasil enzim protease pada ikan seperti organ hepatopankreas pada penelitian (Sriket *et al.*, 2012), organ viscera/jeroan ikan pada penelitian (Nasri *et al.*, 2011), organ usus pada penelitian (Rengasamy *et al.*, 2016). Bagian lain yang dapat menghasilkan enzim protease yaitu bagian otot dan dapat disebut sebagai *muscle protease*. Terdapat beberapa bagian pada otot yang diketahui sebagai penghasil enzim protease seperti bagian otot pada penelitian (Yoshida *et al.*, 2015). Bagian kulit juga dapat dijadikan sebagai penghasil enzim protease yang dapat disebut sebagai *skin protease*. Namun, pada bagian kulit jarang sekali ditemukan pada setiap spesies. Terdapat beberapa penelitian yang menemukan kulit sebagai penghasil enzim protease seperti pada penelitian (Ahmad *et al.*, 2011).

Organ pencernaan merupakan organ yang berpotensi untuk menghasilkan enzim protease. Hal ini dikarenakan, proses pencernaan pada ikan langsung menuju saluran pencernaan. Selain itu, enzim protease pada tubuh ikan juga dihasilkan pada pankreas. (Kandasamy *et al.*, 2012).

3.3.3 Berat Molekul, Pengaruh pH dan Suhu Terhadap Aktivitas Enzim Protease

Protease mengacu pada sekelompok enzim yang fungsi katalitiknya adalah untuk menghidrolisis ikatan peptida. Protease memiliki beberapa parameter dalam aktivitas enzim protease itu sendiri. Enzim protease akan memiliki aktivitas yang maksimum jika mencapai titik-titik tertentu. Enzim protease memiliki titik optimum nilai pH dan suhu untuk menentukan aktivitas maksimum dari enzim protease. Disamping itu, enzim protease juga memiliki nilai kisaran dari berat molekul (Lario *et al.*, 2015). Beberapa referensi dari berat molekul dan pengaruh (pH dan suhu) dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Berat Molekul, Pengaruh pH dan Suhu Terhadap Aktivitas Enzim Protease

Sumber	Tipe Enzim	Berat Molekul	pH	Suhu	Referensi
Ikan Lemuru (<i>Sardinella longiceps</i>)	Alkaline Serine Protease	20,1 kDa	9	40°C	Maruthiah <i>et al.</i> , 2013
Kerang Hijau (<i>Perna viridis</i>)	Alkaline Serine Protease	37 kDa	9	60-65°C	Padmapriya <i>et al.</i> , 2012
Sedimen Laut Coachin	Alkaline Serine Protease	30 kDa	4,5-7,5	30-60°C	Chellappan <i>et al.</i> , 2011
Cacing Laut Siasia	Serine Protease	28 kDa	8-9	30-40°C	Ge <i>et al.</i> , 2018
Udang Galah	Serine Protease	17 kDa	8	55°C	Sriket <i>et al.</i> , 2012
Udang Vannamei	Serine Protease	24 kDa	7-11	60°C	Senphan <i>et al.</i> , 2015
Makarel Kuda	Cysteine Protease	28 kDa	5	50°C	Yoshida <i>et al.</i> , 2015

3.3.4 Pengaruh Senyawa Inhibitor Terhadap Aktivitas Enzim Protease

Inhibitor enzim protease merupakan protein atau peptida yang mampu menghambat aktivitas katalitik enzim proteolitik. Selain itu, penentuan inhibitor enzim protease juga dapat menentukan golongan dari enzim protease. Terdapat senyawa inhibitor yang diujikan pada enzim protease pada umumnya yaitu STI, PMSF, TLCK dan EDTA (Mourão dan Schwartz, 2013). Beberapa referensi dari protein inhibitor yang menghambat aktivitas enzim protease dapat dilihat pada

Tabel 6.

Tabel 6. Pengaruh Senyawa Inhibitor Terhadap Aktivitas Enzim Protease

Sumber	Protease Inhibitor	Konsentrasi	Relative Activity (%)	Referensi
Marine Bacteria	EDTA	5 mM	52	Abou-Elela <i>et al.</i> , 2011
Ikan Kakap Umela (<i>Lutjanus vitta</i>)	Kontrol	-	-	Khantaphant dan Benjakul, 2010
	SBTI	5 mM	99,2	
	EDTA	2 mM	1,4	
	E-64	0,1 mM	0,5	
	TLCK	5 mM	99,2	
Ikan Trout Pelangi (<i>Oncorhynchus Mykiss</i>)	TPCK	5 mM	0,9	Adevvari <i>et al.</i> , 2019
	Kontrol	-	-	
	Trypsin	1 g/L	14,84	
	SBTI	1 g/L	19,62	
	EDTA	5 mM	43,09	
	Pepstatin A	1 g/L	93,45	

3.3.5 Pengaruh Ion Logam Terhadap Aktivitas Enzim Protease

Ikatan logam merupakan ikatan yang dibentuk akibat interaksi antar ion logam yang berinteraksi dengan elektron valensinya yang tersebar di sekitarnya dan membentuk awan elektron (Nursa'adah *et al.*, 2020). Logam sendiri terdiri dari logam monovalen dimana logam yang memiliki valensi 1 (Na^+ , K^+) dan logam monovalen yang memiliki valensi 2 (Ca^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+}) (Khaled *et al.*, 2011). Ion logam diketahui berperan sebagai kofaktor untuk aktivitas enzim, dan sering berperan sebagai jembatan garam atau ion antara dua residu asam

amino yang berdekatan (Sevinc dan Demirkan, 2011). Beberapa referensi pengaruh logam terhadap enzim protease dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 7. Pengaruh Ion Logam Terhadap Aktivitas Enzim Protease

Sumber Protease	Logam	Konsentrasi	Relative Activity (%)	Referensi
Jamur (<i>G. putredinis</i>)	HgCl ₂	5 mM	94,53	Savitha <i>et al.</i> , 2011
	CuSO ₄	5 mM	69,49	
	CaCl ₂	5 mM	38,91	
	ZnCl ₂	5 mM	63,34	
Jamur (<i>T. harzianum</i>)	HgCl ₂	5 mM	97,52	Savitha <i>et al.</i> , 2011
	CuSO ₄	5 mM	75,81	
	CaCl ₂	5 mM	52,20	
	ZnCl ₂	5 mM	67,76	
Jamur (<i>Beauveria</i>)	-	-	100	Shankar <i>et al.</i> , 2011
	NaCl	1 mM	100,94	
	CuCl ₂	1 mM	109,42	
	CoCl ₂	1 mM	103,86	
	CdCl ₂	1 mM	96,99	
	MnCl ₂	1 mM	101,51	
	HgCl ₂	1 mM	90,38	
	CaCl ₂	1 mM	92,99	
	KCl	1 mM	91,71	
	FeCl ₃	1 mM	81,67	
Marine Bacteria	CaSO ₄	5 mM	42	Abou-Elela <i>et al.</i> , 2011
	MgSO ₄	5 mM	100	
	CuCl ₂	5 mM	110	
	PbCl ₂	5 mM	90	
	MnCl ₂	5 mM	45	
	CdCl ₂	5 mM	65	

3.4 Ekstraksi dan Purifikasi Enzim Protease

Produksi enzim protease dilakukan melalui dua tahapan yaitu: tahap ekstraksi dan tahap purifikasi. Ekstraksi merupakan tahap dimana, dilakukan pengekstraksian terhadap sampel yang diuji untuk mendapatkan hasil ekstrak kasar. Dalam tahap ekstraksi ini, juga sering disebut sebagai tahap produksi enzim protease. Nantinya, hasil ekstrak kasar inilah yang akan dilakukan uji aktivitas enzim protease dengan cara dilakukan tahap purifikasi (Ramadhani *et al.*, 2015).

3.4.1 Ekstraksi Enzim Protease

Proses ekstraksi enzim menurut Sholihati *et al.* (2015), dapat dilakukan melalui 4 langkah proses yaitu:

1. Pemisahan bahan terlarut dari bahan baku.
2. Mengisolasi bahan baku dari larutan encer yang dihasilkan untuk menghasilkan larutan yang lebih pekat.
3. Memurnikan bahan baku, menghilangkan spesies lain yang mungkin mirip.
4. Pemurnian akhir.

Metode ekstraksi digunakan untuk memisahkan enzim (protein) yang terkandung dalam larutan dengan menggunakan garam mineral, sehingga enzim yang merupakan fraksi berat akan terendapkan di bawah

Limbah kepala (100 g) dicuci dengan aquades dan dihomogenisasi dengan 200 ml buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0 mengandung CaCl_2) selama 5 menit. Hasil dari proses homogenisasi disentrifugasi pada 10.000 rpm selama 30 menit.

Supernatan diambil dan digunakan sebagai sampel ekstrak kasar (Prihanto *et al.*, 2019).

Beberapa referensi proses ekstraksi enzim protease dari berbagai sumber dengan perbedaan larutan buffer dan kecepatan proses sentrifugasi dapat dilihat pada **Tabel 8**.

Tabel 8. Ekstraksi Enzim Protease

Sumber	Larutan Buffer	Kecepatan Sentrifugasi	Referensi
Sedimen Laut Parangipettai	0,05% MgSO ₄ (pH 9)	12.000g, 4°C; 20min	Annamalai <i>et al.</i> , 2014
<i>Sardinella aurita</i>	50mM Phosphate Buffer (pH 7)	13.000g, 4°C;20min	Khaled <i>et al.</i> , 2011
Ikan Patin	10mM Sitrat/HCl (pH 3)	10.000g, 4°C; 10min	Vannabun <i>et al.</i> , 2014
Ikan Patin	10mM Tris-HCl, 10mM CaCl ₂ (pH 8)	10.000g, 40°C; 10min	Vannabun <i>et al.</i> , 2014
Ikan Tenggiri Papan (<i>Scomberomorus Guttatus</i>)	-	10.000g, 10°C; 10min	Rengasamy <i>et al.</i> , 2016
Ikan Lemuru (<i>Sardinella longiceps</i>)	1,5% peptone, 1% glukosa, 0,75% sodium nitrat, 0,1% potassium klorida 0,1% magnesium klorida 6%NaCl (pH 7)	10.000g, 4°C	Maruthiah <i>et al.</i> , 2013

Ekstraksi enzim protease pada umumnya dilakukan untuk menghasilkan ekstrak kasar enzim yang selanjutnya akan dilakukan purifikasi untuk mengetahui aktivitas dari enzim protease. Dari beberapa referensi diatas, dapat dilihat terdapat beberapa metode dalam melakukan ekstraksi enzim protease. Ditemukan waktu dan suhu inkubasi pada penelitian (Annamali *et al.*, 2014), (Khaled *et al.*, 2011), (Padmapriya *et al.*, 2012) dan (Maruthiah *et al.*, 2013). Dari beberapa referensi , ditemukan pada semua penelitian bahwa dilakukannya proses sentrifugasi.

Proses sentrifugasi ini, merupakan proses akhir dalam ekstraksi untuk menghasilkan supernatan sebagai bahan lanjutan untuk dilakukannya proses purifikasi. Penentuan metode ekstraksi enzim tergantung oleh sumber enzim (Al-Abdalall dan Al-Khaldi, 2016).

3.4.2 Purifikasi Enzim Protease

Purifikasi enzim atau pemurnian enzim merupakan suatu proses yang dilakukan untuk menghasilkan karakteristik enzim yang lebih baik jika dibandingkan dengan ekstrak kasar enzim. Proses purifikasi dapat dilakukan melalui dua tahapan besar, yaitu pemurnian dalam jumlah besar dan pemurnian dalam jumlah kecil. Proses purifikasi dilakukan berdasarkan dengan memanfaatkan pH atau suhu ekstrim, partisi fase dengan pelarut organik, penambahan bubuk resin *ion exchange* maupun dengan teknik *salting out*.

Pemilihan metode purifikasi enzim protease bergantung pada sifat enzim yang memiliki perbedaan kelarutan, ukuran dan muatan (Suhito, 2016).

3.4.2.1 Metode Presipitasi menggunakan Amonium Sulfat

Metode purifikasi yang sering digunakan yaitu dengan prinsip *salting out* yang menggunakan amonium sulfat. Prinsip *salting out* didasari oleh kompetisi antara ion garam dan molekul protein untuk berikatan dengan air. Keuntungan dari metode menggunakan amonium sulfat yaitu memiliki molaritas yang besar sehingga hampir seluruh protein dapat diendapkan, memiliki densitas rendah sehingga pada proses sentrifugasi amonium sulfat tidak ikut terendapkan, serta akan menghasilkan panas pelarutan yang rendah sehingga protein tidak terdenaturasi (Octarya *et al.*, 2013).

Pengendapan enzim kasar amonium sulfat dilakukan untuk tahap pemurnian protease. Amonium sulfat ditambahkan ke enzim kasar dengan saturasi (80%), diaduk selama 30 menit dan dibiarkan tahan semalaman pada suhu 4°C. Endapan dikumpulkan melalui sentrifugasi pada 10000 rpm selama 10 menit, dilarutkan dalam 1–2 volume pelet 25 mM Tris–buffer HCl (pH 8) dan didialisis dengan buffer yang sama pada suhu 4°C (Saranya *et al.*, 2018).

3.4.2.2 Metode Dialisis

Metode Dialisis merupakan metode purifikasi bertujuan untuk meningkatkan kemurnian suatu molekul dalam tahap purifikasi. Dialisis merupakan proses yang terjadi akibat adanya difusi pada membran semi permeabel (Younes *et al.*, 2014). Dialisis dilakukan agar garam-garam anorganik tidak mengganggu tahap pemurnian enzim selanjutnya (Al-Abdalall dan Al-Khaldi, 2016). Dialisis umumnya dapat dilakukan dengan menggunakan tabung selofan yang memiliki ukuran pori-pori lebih kecil dari ukuran protein sehingga protein tidak dapat keluar dari tabung selofan (Prihantini *et al.*, 2013).

Sampel yang didialisis dimuat bagian atas *DEAE-Sepharose Fast Flow* (Sigma, USA) kolom (1.2 x 20 cm) dan disetimbangkan dengan 50 mM Tris- Buffer HCl pH 7,2. Protein tak terikat dikumpulkan dengan buffer yang sama dan protein terikat dielusi oleh gradien linier dengan 0–1 M NaCl pada laju aliran 0,5 ml/menit dan setiap fraksi (2,0 ml) dikumpulkan. Kemudian fraksi dianalisis untuk aktivitas protease dan sangat tinggi fraksi aktif dikumpulkan dan dipekatkan dengan menggunakan Ultra filter sentrifugal. Semua elusi dipantau dengan pengambilan absorbansi pada 280 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Maruthiah *et al.*, 2013).

3.4.2.3 Metode Ion Exchange Chromatography (IEC)

Ion Exchange Chromatography (IEC) merupakan teknik penyerapan yang banyak digunakan untuk memisahkan peptida, protein, asam nukleat dan biopolimer yang memiliki muatan tertentu dengan ukuran dan sifat molekul yang berbeda (Bhattacharya dan Rohrer, 2012). Prinsip dari IEC terjadinya pembentukan ikatan ionik akibat muatan ion yang berbeda. Tingkat interaksi terjadi tergantung dari muatan yang dimiliki (Fekete *et al.*, 2015).

Pada mekanisme kerja *ion exchange chromatography* (IEC), ion yang memiliki muatan positif akan mengikat ion yang memiliki muatan negatif yang disebut *anion exchanger*. Sedangkan ion yang memiliki muatan negatif akan mengikat ion yang memiliki muatan positif disebut *cation exchanger*. Mula-mula grup *ion exchanger* disiapkan pada fase diam berdasarkan karakteristik pH dan kekuatan ioniknya (Suhito, 2016).

Tahap pemurnian menggunakan metode kromatografi penukar ion menurut Nadeem *et al.* (2013), dilakukan dengan memasukkan larutan enzim pada matriks DEAE Sephadex A 50 yang telah di ekuilibrasikan dengan larutan buffer fosfat (0,05 M; pH 7,0). Kemudian, dilakukan elusi pada kolom matriks menggunakan larutan buffer yang sama dengan tujuan melarutkan protein yang tidak terikat dalam matriks. Hasil protein yang tidak larut dalam matriks dibilas dengan menggunakan larutan NaCl 0,05 M pada larutan buffer serupa pada kecepatan aliran elusi 30 ml/jam dengan hasil elusi 3 ml dan dilakukan pengukuran pada panjang gelombang sebesar 280 nm serta pengukuran aktivitas protease

3.4.2.4 Metode *Exclusion Chromatography*

Kromatografi eksklusi sering disebut kromatografi permeasi gel atau filtrasi gel. Fase diam tidak berpengaruh pada proses metode kromatografi eksklusi. Pemisahan pada kromatografi eksklusi didasarkan pada ukuran molekul zat tertentu. Prinsip dari pemisahan kromatografi eksklusi, dimana perbedaan komponen ukuran akan mempengaruhi lama waktu terjadinya elusi (Febrian *et al.*, 2015).

Sampel hasil pemurnian menggunakan kromatografi penukar ion (IEC) dimasukkan ke dalam kolom berisi Sephadex G-50 *size exclusion chromatography* yang telah di ekuilibrasikan. Elusi dilakukan dengan menggunakan larutan buffer Tris-

HCl (20 mM, pH 8,0) sebanyak 1 CV (*column volume*) dan fraksi ditampung setiap 4 ml (Nasution *et al.*, 2018).

3.4.2.5 Metode Kromatografi Adsorpsi

Salah satu metode kromatografi yang sejak lama telah digunakan Wulandari, (2011). adalah metode kromatografi adsorpsi. Zat padat berperan sebagai fase diam sedangkan zat cair atau gas berperan sebagai fase gerak dalam metode kromatografi adsorpsi. Bentuk padat yang terbentuk pada fase diam dapat berupa gel silika atau alumina yang luas permukannya relatif besar. Prinsip pemisahan pada metode kromatografi adsorpsi, didasarkan pada adsorpsi analit pada permukaan fase diam.

Pemurnian sampel mangrove dilakukan dengan kromatografi lapis tipis (KLT). KLT dilakukan pada plat silika gel (Merck) pada eluen kloroform dan metanol dengan perbandingan 60:40, 40:60, 50:50, 30:70, 20:80, 10:90. Penampak noda yang digunakan adalah pereaksi serum sulfat (Mustopa *et al.*, 2012).

3.4.2.6 Metode Kromatografi Partisi

Kromatografi partisi memiliki fase diam dan fase gerak berupa zat cair atau gas. Prinsip pemisahan kromatografi partisi dilakukan akibat adanya perbedaan kelarutan komponen pada fase diam dengan fase gerak yang biasa disebut dengan *gas chromatography* atau adanya perbedaan kelarutan komponen dalam fase gerak dengan fase diamnya yang biasa disebut *liquid chromatography*. Contoh khas dari kromatografi partisi yang sering digunakan karena efisien sebagai pemisah senyawa organik adalah kromatografi kolom (Ardianingsih, 2010).

Untuk mengkarakterisasi produk yang dibentuk oleh aksi fruktosiltransferase pada sukrosa dilakukan menggunakan kromatografi kertas.

Komposisi sistem pelarut yang digunakan etil asetat:isopropanol:air:piridin (26:14:7:2). Campuran pelarut direaksikan dengan larutan gula (glukosa, fruktosa dan maltosa) pada kertas kromatografi Whatman No. 1 dan dibiarkan selama 5 jam. Kemudian, kertas kromatografi dikeluarkan dan dikeringkan di udara. Gula yang dipisahkan, divisualisasikan menggunakan Aniline diphenylamine sebagai reagen penyemprotan (Dake dan Kumar, 2012).

Beberapa referensi purifikasi enzim protease dari berbagai sumber enzim dan jenis purifikasi dapat dilihat pada **Tabel 9**.

Tabel 9. Purifikasi Enzim Protease

Sumber	Jenis Purifikasi	Metode Purifikasi	Referensi
Limbah ikan	Semi	Presipitasi, Dialisis Kromatografi Penukaran Ion	Saranya <i>et al.</i> , 2018
Ikan Nila (<i>Oreochromis niloticus</i>)	Parsial	Presipitasi, Dialisis	Prihanto <i>et al.</i> , 2019
Sedimen muara Rajakkamangalam	Parsial	Presipitasi Dialisis	Maruthiah <i>et al.</i> , 2017
Ikan Tenggiri Papan (<i>Scomberomorus Guttatus</i>)	Parsial	Presipitasi, Dialisis	Rengasamy <i>et al.</i> , 2016
Ikan Lemuru (<i>Sardinella longiceps</i>)	Semi	Presipitasi, Dialisis Kromatografi Penukaran Ion	Maruthiah <i>et al.</i> , 2013
Kerang Hijau (<i>Perna viridis</i>)	Semi	Presipitasi, Dialisis Kromatografi Penukaran Ion	Padmapriya <i>et al.</i> , 2012
Ikan Kakap Umela (<i>Lutjanus vitta</i>)	Semi	Presipitasi, Dialisis Kromatografi Penukaran Ion	Khantaphant dan Benjakul, 2010
Jamur (<i>Pleurotus eryngii</i>)	-	Dialisis, Kromatografi Eksklusi	Ma <i>et al.</i> , 2014

Jamur
(*Flammulina
velutipes*)
Bakteri (*E. Coli*)

Ekstrak Buah
Mangrove
(*Avicennia
marina*)
Paprika
(*Capsicum
annuum*)

Jamur
(*Aureobasidium
pullulans*)

Parsial

Dialisis,
Kromatografi
Eksklusi
Presipitasi,
Dialisis,
Kromatografi
Eksklusi
Kromatografi
Adsorpsi
Kromatografi
Adsorpsi
Presipitasi,
Kromatografi
Partisi

Yang *et al.*,
2012
Nasution *et
al.*, 2018
(Mustopa *et
al.*, 2012)
Rebecca *et
al.*, 2014
Dake dan
Kumar, 2012

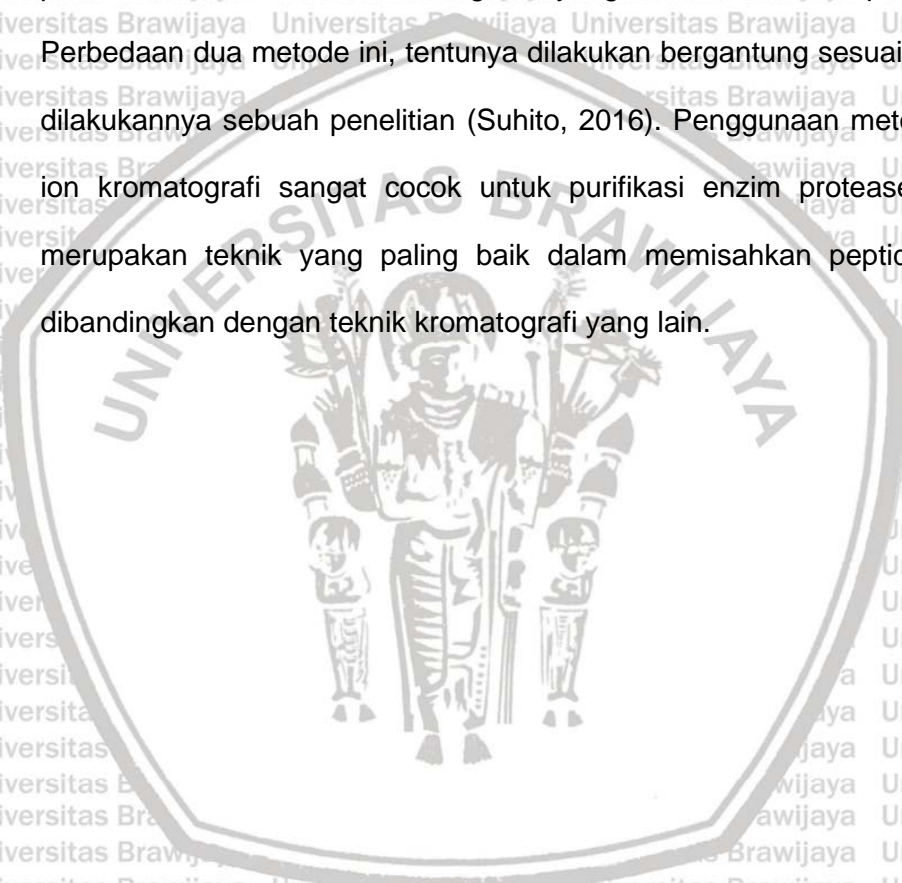
Purifikasi dilakukan untuk mengetahui aktivitas enzim protease secara terperinci. Purifikasi sendiri terbagi menjadi dua jenis yaitu semi purifikasi dan purifikasi parsial. Dari beberapa referensi pada **Tabel 9**, dapat dilihat bahwa terdapat beberapa penelitian yang melakukan tahap purifikasi secara berbeda. Pada penelitian (Saranya *et al.*, 2018), (Padmapriya *et al.*, 2012) dan (Khantaphan dan Benjakul, 2010) dapat diketahui bahwa dilakukan semi purifikasi dengan penggunaan *DEAE-Sephadex Column Chromatography*. Sedangkan, pada penelitian (Prihanto *et al.*, 2019), (Rengasamy *et al.*, 2016) dan (Maruthiah *et al.*, 2013) dan dapat diketahui bahwa dilakukan purifikasi parsial dengan penggunaan *Sephadex G-25* pada penelitian (Rengasmy *et al.*, 2016 dan Maruthiah *et al.*, 2013) dan penggunaan *cellophane* pada penelitian (Prihanto *et al.*, 2019). Pada penelitian (Ma *et al.*, 2014), (Yang *et al.*, 2012) dan (Nasution *et al.*, 2018) dilakukan purifikasi menggunakan metode kromatografi eksklusi dengan *Sephadex G-100 size exclusion*. Pada penelitian (Mustopa *et al.*, 2012) dan (Rebecca *et al.*, 2014) dilakukan purifikasi menggunakan metode kromatografi adsorpsi dengan kromatografi lapis tipis (KLT). Pada penelitian (Dake dan Kumar, 2012) dilakukan purifikasi menggunakan metode kromatografi partisi dengan

kromatografi kertas.

Perbedaan dari semi purifikasi dan purifikasi parsial terdapat pada metode pemurnian yang digunakan, dimana pada semipurifikasi dilakukan tiga metode pemurnian yaitu presipitasi, dialisis dan pertukaran ion dengan kromatografi.

Sedangkan pada purifikasi parsial, pada umumnya hanya dilakukan dua metode pemurnian yaitu presipitasi dan dialisis. Hasil purifikasi yang dihasilkan dari semi purifikasi lebih murni dibandingkan yang dihasilkan dari purifikasi parsial.

Perbedaan dua metode ini, tentunya dilakukan bergantung sesuai dengan tujuan dilakukannya sebuah penelitian (Suhito, 2016). Penggunaan metode pertukaran ion kromatografi sangat cocok untuk purifikasi enzim protease, dikarenakan merupakan teknik yang paling baik dalam memisahkan peptida dan protein dibandingkan dengan teknik kromatografi yang lain.



3.4.2.7 Summary of Purification

Beberapa referensi terkait hasil purifikasi pada tabel *summary of purification* dari enzim protease yang berasal dari beberapa sumber dapat dilihat pada **Tabel 10**.

Tabel 10. Tabel *Summary of Purification*

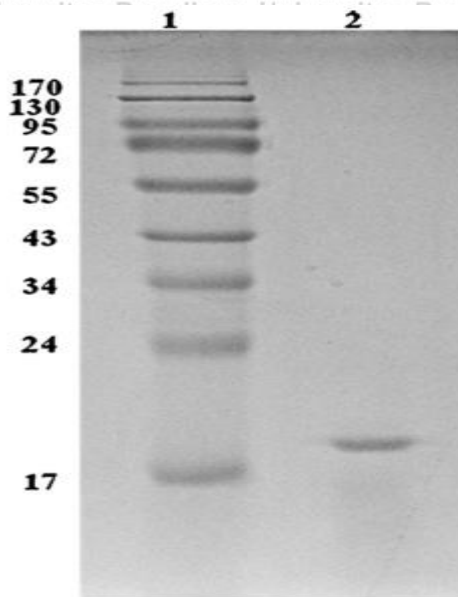
Sumber	Standar	Step	Total Activity (U)	Total Protein (mg)	Specific Activity (U/mg)	Yield (%)	Purification fold	Referensi
Ikan Sarden	BSA	Kultur Filtrat	165,9	404,45	0,410	100	1,0	Maruthiah <i>et al.</i> , 2013
		Presipitasi	98,89	134,2	0,73	59,60	1,78	
		Amonium Sulfat						
		DEAE Sepharose	62,9	14,6	4,30	37,91	10,48	
		Sephadex G-75	39,8	3,51	11,33	23,99	27,63	
Limbah Ikan	BSA	Ekstrak Kasar	10.075,3	115,3	87,4	100	1,0	Saranya <i>et al.</i> , 2018
		Presipitasi	7378,0	40,5	182,2	73,2	2,1	
		Amonium Sulfat						
		Sephadex G-25	1065,8	3,1	343,8	10,6	3,9	
		DEAE column	774,9	2,2	352,2	7,7	4,0	
Kepala Ikan Nila	BSA	Ekstrak Kasar	42,93	72,0	0,60	-	1,0	Prihanto, <i>et al.</i> , 2019
		(NH ₄) ₂ SO ₄ 30%	16,56	6,6	2,51	-	4,18	
		(NH ₄) ₂ SO ₄ 40%	21,40	5,3	4,04	-	6,73	
		(NH ₄) ₂ SO ₄ 50%	20,87	5,0	4,17	-	6,90	
		(NH ₄) ₂ SO ₄ 60%	20,88	3,9	5,35	-	8,92	
		Dialisis	30,21	2,37	12,75	-	21,25	

Pada *summary of purification* terdapat beberapa parameter yang diketahui seperti aktivitas total, total protein, aktivitas spesifik, persentase *yield* dan *purification fold*. Pada *summary of purification* dilakukan beberapa uji pada setiap tahapan proses purifikasi untuk mengetahui pada metode mana yang menghasilkan enzim protease yang terbaik. Hasil yang diharapkan dari proses purifikasi enzim ini ialah didapatkan *yield* dari enzim maksimal yang diisolasi dan kenaikan aktivitas spesifik serta *purification factor*-nya (Suhito, 2016). BSA (*Bovine Serum Albumin*) dilakukan sebagai standar pengukuran protein. BSA digunakan sebagai kurva standar yang digunakan sebagai pembanding untuk menentukan kadar protein dari absorbansi pada pengukuran dengan spektrofotometer (Xu *et al.*, 2013).

3.4.3 Perhitungan Aktivitas Enzim Protease

3.4.3.1 Perhitungan Berat Molekul Enzim Protease

Berat molekul enzim yang dimurnikan ditentukan dengan menggunakan metode *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) menggunakan gel penyusun 5% (w/v) dan 12% (w/v) gel pemecah polyarsilamida. Setelah elektroforesis, gel diwarnai dengan *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) R-250 dan dihancurkan dengan larutan yang mengandung metanol:asam asetat glasial:air suling (1: 1: 8). Kalibrasi dilakukan dengan menggunakan kit penanda protein jarak rendah (Mander *et al.*, 2011).



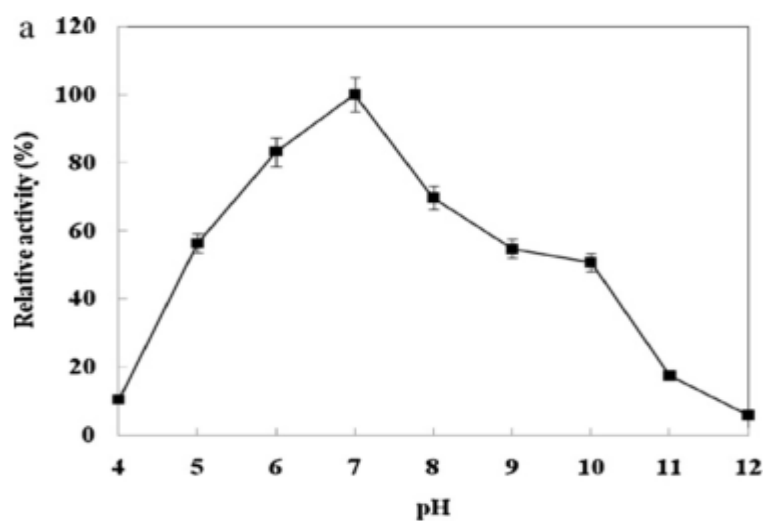
Gambar 5. Hasil Analisis Berat Molekul Enzim Protease (Mander *et al.*, 2015)

Pada **Gambar 5**, didapatkan hasil dari analisis berat molekul enzim protease. Pada hasil analisis terdapat dua kolom (1 dan 2). Kolom 1 merupakan protein standar dengan nilai kDa sebagai penanda. Sedangkan kolom 2 merupakan nilai kDa dari berat molekul enzim protease yang dianalisis. Sehingga, pada analisis berat molekul enzim pada **Gambar 5** didapatkan berat molekul sebesar 18 kDa.

3.4.3.2 Perhitungan Aktivitas Enzim Protease Terhadap pH

Aktivitas enzim protease dapat ditentukan oleh nilai pH optimum bagi enzim protease. Penentuan pH optimum dari enzim yang dimurnikan dilakukan pada kisaran pH 6,0-13,0 pada 70°C menggunakan kasein 1% (w/v) sebagai substrat. Pengaruh pH terhadap stabilitas enzim protease diuji dengan menginkubasi enzim dalam buffer dengan nilai pH yang berbeda dalam kisaran nilai pH 5,0-13,0 selama 1 jam pada suhu 25°C. Larutan buffer yang digunakan: natrium asetat 100 mM untuk buffer pH 5,0-6,0; 100mM kalium fosfat untuk pH 7,0-7,5; Tris-HCl 100 mM untuk pH 8,0-8,5; 100mM glisin-buffer NaOH untuk pH 9,0-11,0 dan 100mM KCl - NaOH untuk pH 12,0-13,0. (Jellouli *et al.*, 2011).

PH optimum dari ekstrak protease kasar ditentukan pada kisaran pH 5,0-13,0 menggunakan kasein sebagai substrat pada suhu 50°C. Untuk pengukuran stabilitas pH, ekstrak protease kasar diinkubasi selama 1 jam pada suhu 4°C dalam larutan penyangga yang berbeda dan aktivitas proteolitik sisa, ditentukan dalam kondisi uji standar. Larutan penyangga yang digunakan: 100 mM natrium asetat untuk pH 5.0-6.0; Tris-HCl untuk pH 7.0-8.0; glisin NaOH untuk pH 9.0-11.0, Na₂HPO₄-NaOH untuk pH 12,0 dan KCl untuk pH 13,0 (Nasri *et al.*, 2011).



Gambar 6. Hasil Analisis Aktivitas Enzim Protease Terhadap pH (Mander *et al.*, 2015)

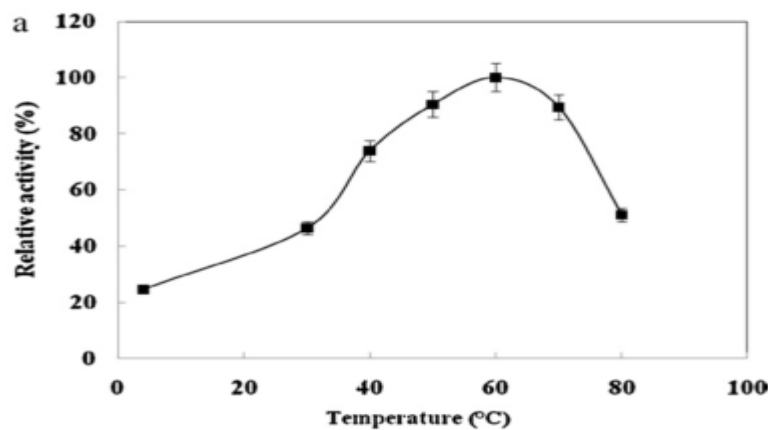
3.4.3.3 Perhitungan Aktivitas Enzim Protease Terhadap Suhu

Aktivitas optimal dari enzim protease dapat ditentukan oleh nilai suhu optimal dari enzim protease. Untuk menentukan suhu optimal dari enzim protease dilakukan pada suhu yang berbeda (20–90°C). Larutan kasein (1% w/v) dalam 50 mM dari buffer campuran (pH 5,5) diinkubasi pada suhu yang diinginkan selama 5 menit, dan kemudian pengujian dapat dilakukan (Salehi *et al.*, 2017).

Pengaruh suhu pada aktivitas protease ditentukan mulai dari suhu 50°C sampai 80°C menggunakan kasein sebagai substrat selama 10 menit dalam 100mM glycine-buffer NaOH pada pH 10,0. Stabilitas suhu diperiksa dengan menginkubasi enzim yang dimurnikan selama 120 menit pada suhu yang berbeda.

Pada kondisi standar, enzim yang tidak dipanaskan dianggap sebagai kontrol (100%) (Souza *et al.*, 2017).

Pengaruh suhu terhadap produksi protease menurut Maghsoodi *et al.* (2013), dapat ditentukan dengan cara menumbuhkan bakteri dalam media fermentasi yang diatur pada suhu yang berbeda (25–55°C) pada 150 rpm dan pH 7,6. Pengaruh kecepatan agitasi terhadap produksi protease ditentukan dengan media inkubasi bakteri fermentasi pada suhu 37°C, pH 7,6 dalam kondisi penghomogenan; 100, 130, 150, 180,200 rpm.



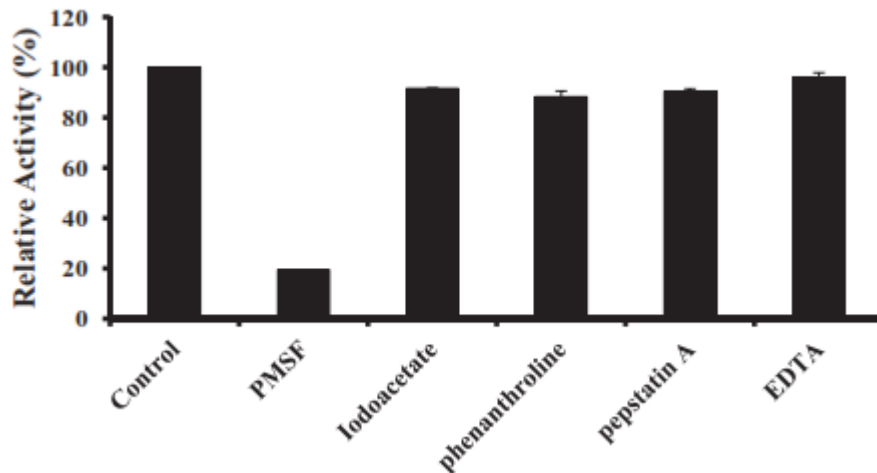
Gambar 7. Hasil Analisis Enzim Protease Terhadap Suhu (Mander *et al.*, 2015)

3.4.3.4 Analisis Pengaruh Sengawa Inhibitor Terhadap Aktivitas Enzim Protease

Analisis inhibitor enzim protease dilakukan untuk mengetahui aktivitas residu dari inhibitor enzim protease terhadap aktivitas enzim protease. Protease inhibitor *ethylene diamine tetraacetic acid* (EDTA) konsentrasi 5 mM diuji dengan dilakukan inkubasi pada suhu 50°C dalam 30 menit dan dilakukan pengukuran aktivitas residu (%) dengan uji protease standar (Abou-Elela *et al.*, 2011)

Inhibitor protease (PMSF (*phenylmethylsulfonyl fluoride*), TLCK (*Tosyl-L-lysyl-chloromethane hydrochloride*), STI (*Soybean trypsin inhibitor*) dan EDTA (*ethylene diamine tetraacetic acid*)) dengan konsentrasi 1 mM diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang. Aktivitas residu (%) pada masing-masing campuran enzim

diuji dengan metode Bergmeyer (Sajuthi *et al.*, 2011). Inkubasi merupakan masa antara inokulasi sampai pertumbuhan koloni yang memiliki karakteristik (Sulistiyarsi *et al.*, 2016).



Gambar 8. Aktivitas Inhibitor Enzim Protease (Saranya *et al.*, 2018)

3.4.3.5 Analisis Pengaruh Logam Terhadap Aktivitas Enzim Protease

Untuk mengetahui pengaruh ion logam terhadap aktivitas protease, dilakukan reaksi enzim dengan menginkubasi campuran reaksi yang mengandung 1,0 ml enzim; 4,0 ml buffer sodium fosfat (50 mM; pH 7,0); 1% substrat kasein; 1,0 ml logam dengan konsentrasi 5 mM larutan ion (Hg^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+}) (Savitha *et al.*, 2011).

Pengaruh berbagai ion logam (5 mM) terhadap aktivitas protease adalah dipelajari dengan menambahkan logam monovalen (Na^+ dan K^+) dan logam divalen (Ca^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Hg^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+}) ion logam ke campuran reaksi. Aktivitas sampel tanpa ion logam digunakan sebagai kontrol (Adevari *et al.*, 2019).

3.5 Enzim Protease dari Limbah Hasil Perikanan

Protease merupakan salah satu enzim yang berperan penting sebagai nutrisi dan pengaturan peran di alam. Protease secara fisiologis diperlukan untuk organisme hidup. Hal ini menyebabkan, enzim protease hampir dapat ditemukan

pada semua makhluk hidup (Muthulakshmi *et al.*, 2011). Beberapa organ seperti lambung, pankreas dan usus dari produk samping adalah sumber penghasil enzim yang cukup besar (Shahidi *et al.*, 2019). Enzim protease dapat ditemukan pada organ dari ikan yang tidak dimanfaatkan. Organ dari ikan yang memiliki kandungan enzim protease yang cukup tinggi terdapat pada bagian organ saluran pencernaan khususnya organ jeroan (Chaijaroen dan Thongruang, 2016). Beberapa referensi enzim protease dari limbah hasil perikanan dapat dilihat pada Tabel 11.

Tabel 11. Enzim Protease dari Limbah Hasil Perikanan

Sumber	Organ	Jenis Protease	Referensi
Ikan Trout Pelangi (<i>Oncorhynchus Mykiss</i>)	Jeroan	Alkaline Protease	Adevvari <i>et al.</i> , 2019
Ikan Rohu (<i>Labeo rohita</i>)	Jeroan	-	Geethanjali dan Subash, 2012
Ikan Kakap Merah (<i>Lutjanus campechanus</i>)	Jeroan	Alkaline Protease	Sabtecha <i>et al.</i> , 2014
Ikan Tenggiri Papan (<i>Scomberomorus guttatus</i>)	Jeroan	Alkaline Protease	Sabtecha <i>et al.</i> , 2014
Ikan Barakuda (<i>Sphyaena barracuda</i>)	Jeroan	Alkaline Protease	Sabtecha <i>et al.</i> , 2014
Ikan Cucut (<i>Rhizoprionodon acutus</i>)	Jeroan	Alkaline Protease	Sabtecha <i>et al.</i> , 2014
Ikan Lemuru (<i>Sardinella longiceps</i>)	Jeroan	Alkaline Protease	Sabtecha <i>et al.</i> , 2014
Kerang Hijau (<i>Perna viridis</i>)	Cangkang	Alkaline Serine Protease	Padmapriya <i>et al.</i> , 2012
Ikan Lemuru (<i>Sardinella longiceps</i>)	Usus	Alkaline Serine Protease	Maruthiah <i>et al.</i> , 2013
Limbah Ikan	Jeroan	Alkaline Protease	Saranya <i>et al.</i> , 2018
<i>Sardinella aurita</i>	Jeroan	Aspartic Protease	Khaled <i>et al.</i> , 2011
Ikan Nila (<i>Oreochromis niloticus</i>)	Kepala	-	Prihanto <i>et al.</i> , 2019
<i>Serranus scriba</i>	Jeroan	Alkaline Protease	Nasri <i>et al.</i> , 2015
Ikan Makarel Jack Jepang (<i>Trachurus japonicus</i>)	Otot	Sistein Protease	Yoshida <i>et al.</i> , 2015
Ikan Patin	Jeroan	Alkaline Protease	Vannabun <i>et al.</i> , 2014

Ikan Tenggiri Papan (<i>Scomberomorus Guttatus</i>)	Usus	Alkaline Protease	Rengasamy <i>et al.</i> , 2016
Goby (<i>Zosterisessor ophiocephalus</i>)	Jeroan	Alkaline Protease	Nasri <i>et al.</i> , 2011
Ikan Pari Punggung (<i>R. clavata</i>)	Jeroan	Alkaline Protease	Nasri <i>et al.</i> , 2011
Scorpionfishes (<i>S. scrofa</i>)	Jeroan	Alkaline Protease	Nasri <i>et al.</i> , 2011
Ikan Kakap Umela (<i>Lutjanus vitta</i>)	Pyloric caeca	Serine Protease	Khantapant dan Benjakul, 2010
Ikan Nila (<i>Nile tilapia</i>)	Jeroan	Alkaline Protease	Ketnawa <i>et al.</i> , 2013

Berdasarkan beberapa referensi dari enzim protease yang dihasilkan dari limbah hasil perikanan menunjukkan bahwa organ saluran pencernaan (jeroan) yang paling banyak menghasilkan enzim protease. Hal ini dikarenakan, proses pencernaan dari ikan melalui mulut dan langsung menuju saluran pencernaan sehingga aktivitas untuk memecah protein paling banyak pada saluran pencernaan dibandingkan dengan kulit dan otot.

Enzim protease menurut Syahrir *et al.* (2020), merupakan enzim hidrolase yang merupakan enzim yang memecah substrat dengan bantuan air. Proses kerja dari enzim protease sendiri dapat dijelaskan sebagai rantai berjalan, yaitu setelah makanan masuk ke dalam saluran pencernaan (dari lambung menuju usus) yang diikuti oleh produksi enzim protease. Dengan masuknya makanan yang sebagian besar dicerna dalam saluran pencernaan, maka enzim protease banyak ditemukan pada saluran pencernaan dari ikan. Pada penelitian Sabtecha *et al.* (2014), aktivitas enzim protease pada jeroan dari ikan kakap merah sebesar 57,67 U, sedangkan aktivitas spesifik enzim protease sebesar 58,80 U/mg.

3.5.1 Ekstraksi Enzim Protease dari Limbah Hasil Perikanan

Beberapa referensi ekstraksi enzim protease dari limbah hasil perikanan dari berbagai macam sumber spesies dan organ dapat dilihat pada **Tabel 12**.

Tabel 12. Ekstraksi Enzim Protease dari Limbah Hasil Perikanan

Sumber	Organ	Larutan Buffer	Kecepatan Sentrifugasi	Referensi
Limbah Ikan	Jeroan	0,1 mM Tris-HCl (pH 8)	10.000g, 4°C; 10min	Saranya <i>et al.</i> , 2018
Ikan Rohu (<i>Labeo rohita</i>)	Jeroan	10 mM Tris-HCl (pH 8)	8.500g, 4°C; 30min	Geethanjali Subash, 2012
Giant Catfish	Jeroan	10 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl ₂ (pH 8)	10.000g, 40°C; 10min	Vannabun <i>et al.</i> , 2014
<i>Sardinella aurita</i>	Jeroan	50 mM fosfat buffer (pH 7)	13.000g, 4°C; 20min	Khaled <i>et al.</i> , 2011
Ikan nila (<i>Oreochromis niloticus</i>)	Kepala	10 mM Tris-HCl (pH 8)	10.000g, 30 min	Prihanto <i>et al.</i> , 2019
<i>Serranus scriba</i>	Jeroan	10 mM Tris-HCl (pH 8)	8.500g, 4°C; 30 min	Nasri <i>et al.</i> , 2015
Ikan Barakuda (<i>Sphyrna barracuda</i>)	Jeroan	10 mM Tris-HCl (pH 8)	8.500g, 4°C; 30 min	Nasri <i>et al.</i> , 2011
Ikan Cucut (<i>Rhizoprionodon acutus</i>)	Jeroan	10 mM Tris-HCl (pH 8)	8.500g, 4°C; 30 min	Nasri <i>et al.</i> , 2011
Ikan Lemuru (<i>Sardinella longiceps</i>)	Jeroan	10 mM Tris-HCl (pH 8)	8.500g, 4°C; 30 min	Nasri <i>et al.</i> , 2011

Metode ekstraksi merupakan salah satu faktor penting yang perlu diperhatikan dalam memproduksi enzim. Ekstraksi merupakan tahap awal yang dilakukan dalam proses produksi enzim protease dari sumber enzim. Penentuan metode ekstraksi bergantung pada sumber dari enzim protease. Metode ekstraksi dari sumber hewan laut seperti ikan biasanya dilakukan dengan menggunakan *buffer*. Larutan *buffer* dalam proses ekstraksi berfungsi untuk mempertahankan pH (Lamas *et al.*, 2017). Pada beberapa referensi ekstraksi enzim protease dari limbah hasil perikanan pada **Tabel 12**, dapat diketahui bahwa proses ekstraksi menggunakan larutan *buffer* yaitu Tris-HCl pH 8. Setelah dilarutkan dalam larutan *buffer*, ekstraksi dilanjutkan dengan proses sentrifugasi hingga dihasilkan supernatan sebagai ekstrak kasar. Tris-HCl merupakan senyawa organik yang sering digunakan sebagai larutan *buffer* untuk gel elektroforesis. Tris-HCl sangat

larut dalam air dan bereaksi pada pH 7,0-9,0. Tris-HCl paling sering digunakan dengan penggunaan SDS. Tris-HCl berguna untuk mempertahankan pH dan dapat bereaksi pada asam kuat maupun basa kuat (Cui *et al.*, 2017).

3.5.2 Purifikasi Enzim Protease dari Limbah Hasil Perikanan

Beberapa referensi tahap purifikasi enzim protease dari limbah hasil perikanan dari berbagai sumber spesies dan organ dapat dilihat pada **Tabel 13**.

Tabel 13. Purifikasi Enzim Protease dari Limbah Hasil Perikanan

Sumber	Organ	Jenis Purifikasi	Metode Purifikasi	Referensi
Limbah ikan	Jeroan	Semi	Presipitasi, Dialisis, Kromatografi Penukaran Ion	Saranya <i>et al.</i> , 2018
Ikan nila (<i>Oreochromis niloticus</i>)	Kepala	Parsial	Presipitasi, Dialisis	Prihanto <i>et al.</i> , 2019
Ikan Trout Pelangi (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Jeroan	Parsial	Presipitasi, Dialisis	Adevari <i>et al.</i> , 2019
Ikan Rohu (<i>Labeo rohita</i>)	Jeroan	Semi	Presipitasi, Dialisis, Kromatografi Penukaran Ion	Geethanjali dan Subash, 201)
<i>Sardinella aurita</i>	Jeroan	Semi	Presipitasi, Dialisis, Kromatografi Penukaran Ion	Khaled <i>et al.</i> , 2011
Ikan Tenggiri Papan (<i>Scomberomorus guttatus</i>)	Usus	Parsial	Presipitasi, Dialisis	Rengasamy <i>et al.</i> , 2016
Ikan Lemuru (<i>Sardinella longiceps</i>)	Usus	Semi	Presipitasi, Dialisis, Kromatografi Penukaran Ion	Maruthiah <i>et al.</i> , 2013
Kerang Hijau (<i>Perna viridis</i>)	Cangkang	Semi	Presipitasi, Dialisis, Kromatografi Penukaran Ion	Padmapriya <i>et al.</i> , 2012

Ikan Makarel Jack Jepang (<i>Trachurus japonicus</i>)	Otot	Semi	Presipitasi, Dialisis Kromatografi Penukaran Ion	Yoshida et al., 2015
Ikan Kakap Umela (<i>Lutjanus vitta</i>)	<i>Pyloric caeca</i>	Semi	Presipitasi, Dialisis Kromatografi Penukaran Ion	Khantapant dan Benjakul, 2010

Pada **Tabel 13**, terdapat beberapa referensi dari purifikasi enzim protease dari limbah hasil Perikanan. Dari beberapa penelitian, terdapat dua jenis purifikasi yang dilakukan yaitu purifikasi parsial dan semi purifikasi. Semi purifikasi seperti pada penelitian (Saranya et al., 2018), (Geethanjali dan Subash, 2018), (Khaled et al., 2011), (Maruthiah et al., 2013), (Padmapriya et al., 2012), (Yoshida et al., 2015) dan (Khantapant dan Benjakul, 2010) dilakukan dengan tiga metode purifikasi yaitu dimulai dengan presipitasi amonium sulfat, dialisis dan penukaran ion kromatografi. Pada penukaran ion kromatografi, dilakukan dengan menggunakan bantuan DEAE (*diethylaminoethanol*) kromatografi. Sedangkan purifikasi parsial seperti pada penelitian (Prihanto et al., 2019), (Andevani et al., 2019) dan (Gayatri et al., 2016) dilakukan hanya dengan dua metode purifikasi yaitu presipitasi amonium sulfat dan dialisis. Perbedaan dari dua metode ini, jika pada semi purifikasi dihasilkan enzim protease yang lebih murni dibandingkan pada purifikasi parsial (Suhito, 2016).

Beberapa referensi hasil purifikasi enzim protease pada tabel *summary of purification* dari beberapa limbah hasil perikanan dapat dilihat pada Tabel 14.

Tabel 14. Tabel *Summary of Purification* Enzim Protease dari Limbah Hasil Perikanan

Sumber	Organ	Standar	Step	Total Activity (U)	Total Protein (mg)	Specific Activity (U/mg)	Yield (%)	Purification fold	Referensi
Ikan Trout Pelangi (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Jeroan	BSA	Ekstrak Kasar	152,24	433	0,35	100	1,00	Adevari et al., 2019
			(NH ₄) ₂ SO ₄ 20-40%	1,39	4,1	0,34	0,91	0,96	
			(NH ₄) ₂ SO ₄ 40-60%	101,36	88	1,16	66,6	3,29	
			(NH ₄) ₂ SO ₄ 60-80%	5,56	43	0,59	16,79	1,67	
Ikan Rohu (<i>Labeo rohita</i>)	Jeroan	BSA	Ekstrak Kasar	103,00	160	0,64	100	1,00	Geethanjali dan Subash, 2012
			Presipitasi	56,00	54,00	1,04	54,40	1,60	
			Dialisis	53,00	44,25	1,20	51,50	1,90	
			DEAE-cellulose filtrate	5,60	0,65	8,62	5,44	13,40	

Ikan Kakap Merah
(*Lutjanus campechanus*)

Jeroan

BSA

Ekstrak Kasar

7,22

27,40

3,97

-

-

Sabtecha
et al., 2014

Presipitasi

4,44

42,20

9,50

-

-

Sephadex G-100

0,98

57,63

58,80

-

-

Referensi pada **Tabel 14**, menunjukkan tabel *summary of purification* dari beberapa penelitian. Pada penelitian (Andevari *et al.*, 2019), didapatkan purifikasi akhir dengan nilai *yield* 16,79 dan *purification fold* 1,67. Didapatkan enzim protease paling murni pada tahap presipitasi dengan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ konsentrasi 40-60% dengan nilai aktivitas spesifik tertinggi 1,16 U/mg. Pada penelitian (Geethanjali dan Subash, 2018), didapatkan purifikasi akhir dengan nilai *yield* 5,44 dan *purification fold* 13,40. Didapatkan enzim protease paling murni pada tahap penukaran ion dengan DEAE-cellulose filtrate dengan nilai aktivitas spesifik tertinggi 8,62 U/mg. Pada penelitian (Sabtecha *et al.*, 2014), tidak ditemukan nilai *yield* dan *purification fold* namun didapatkan enzim protease paling murni pada tahap dialisis dengan Sephadex G-100 dengan nilai aktivitas spesifik tertinggi 58,80 U/mg.

3.5.3 Berat Molekul, Pengaruh Suhu dan pH Terhadap Aktivitas Enzim Protease dari Limbah Hasil Perikanan

Beberapa referensi aktivitas enzim protease (berat molekul, pH dan suhu) dari berbagai sumber limbah hasil perikanan dapat dilihat pada **Tabel 15**.

Tabel 15. Berat Molekul, Pengaruh Suhu dan pH Terhadap Aktivitas Enzim Protease dari Limbah Hasil Perikanan

Sumber	Organ	Tipe Enzim	Berat Molekul	pH	Suhu	Referensi
Kerang Hijau (<i>Perna viridis</i>)	Cangkang	Alkaline Serine Protease	37 kDa	8	70°C	Padmapriya <i>et al.</i> , 2012
Ikan Lemuru (<i>Sardinella longiceps</i>)	Usus	Alkaline Serine Protease	18,3 kDa	9	40°C	Maruthiah <i>et al.</i> , 2013
Ikan Nila (<i>Oreochromis niloticus</i>)	Kepala	-	-	7,5	38°C	Prihanto <i>et al.</i> , 2019
Ikan Makarel Jack Jepang (<i>Trachurus japonicus</i>)	Otot	Sistein Protease	28 kDa	5	50°C	Yoshida <i>et al.</i> , 2015
<i>Serranus scriba</i>	Jeroan	Alkaline Protease	17 kDa	11	50°C	Nasri <i>et al.</i> , 2015

<i>Sardinella aurita</i>	Jeroan	<i>Aspartic Protease</i>	-	3	40°C	Khaled <i>et al.</i> , 2011
Limbah Ikan	Jeroan	<i>Alkaline Protease</i>	33 kDa	8	30°C	Saranya <i>et al.</i> , 2018

Referensi pada **Tabel 15**, didapatkan aktivitas enzim protease dari limbah hasil perikanan berdasarkan berat molekul, pengaruh pH dan pengaruh suhu terhadap enzim protease. Pada penelitian (Padmapriya *et al.*, 2012) didapatkan berat molekul sebesar 37 kDa. Pada penelitian (Maruthiah *et al.*, 2013) didapatkan berat molekul sebesar 18,3 kDa. Pada penelitian (Yoshida *et al.*, 2015) didapatkan berat molekul sebesar 28 kDa. Pada penelitian (Nasri *et al.*, 2015) didapatkan berat molekul sebesar 11 kDa. Pada penelitian (Saranya *et al.*, 2018) didapatkan berat molekul sebesar 33. Pengukuran berat molekul pada enzim protease dilakukan menggunakan bantuan *Sodium Deodecyl Sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE).

Aktivitas optimum enzim protease terhadap pH pada penelitian (Padmapriya *et al.*, 2012), yaitu pada pH 8 dengan dilakukan uji menggunakan larutan kasein pada pH (6,0-10,0). Pada penelitian (Maruthiah *et al.*, 2013), didapatkan efek pH terhadap aktivitas enzim protease yaitu pada pH 9. dengan dilakukan uji pada pH (5,0-10,0). Pada penelitian (Prihanto *et al.*, 2019), didapatkan efek pH terhadap aktivitas enzim protease yaitu pada pH 7,5 dengan dilakukan uji menggunakan penyangga fosfat pada pH (4,0-10,0). Pada penelitian (Yoshida *et al.*, 2015), didapatkan efek pH terhadap aktivitas enzim protease yaitu pada pH 5 dengan dilakukan uji pada pH (2,0-10,0). Pada penelitian (Nasri *et al.*, 2015), didapatkan efek pH terhadap aktivitas enzim protease yaitu pada pH 11 dengan dilakukan uji menggunakan larutan kasein pada pH (5,0-13,0). Pada penelitian (Khaled *et al.*, 2011), didapatkan efek pH terhadap aktivitas enzim protease yaitu pada pH 3 dengan dilakukan uji menggunakan larutan *acid-denatured bovine haemoglobin* pada pH (1,0-7,0). Pada penelitian (Saranya *et al.*,

2018), didapatkan efek pH terhadap aktivitas enzim protease yaitu pada pH 8 dengan dilakukan uji menggunakan larutan kasein pada pH (3,0-10,0). Enzim protease memiliki aktivitas kaseinolitik pada rentang pH (4-12) (Andevvari *et al.*, 2019). Enzim protease yang memiliki aktivitas optimum pada rentan pH (2-6) disebut protease asam dan pada rentan pH (8-12) disebut protease alkali (Hamza, 2017).

Aktivitas optimum enzim protease terhadap suhu pada penelitian (Padmapriya *et al.*, 2012), yaitu pada suhu 70°C dengan dilakukan uji pada rentan suhu (30°C-70°C). Pada penelitian (Maruthiah *et al.*, 2013), didapatkan efek suhu terhadap aktivitas enzim protease yaitu pada suhu 40°C dengan dilakukan uji pada rentan suhu (20°C-80°C). Pada penelitian (Prihanto *et al.*, 2019), didapatkan efek suhu terhadap aktivitas enzim protease yaitu pada suhu 38°C dengan dilakukan uji pada rentan suhu (25°C-70°C). Pada penelitian (Yoshida *et al.*, 2015), didapatkan efek suhu terhadap aktivitas enzim protease yaitu pada suhu 50°C dengan dilakukan uji pada rentan suhu (20°C-70°C). Pada penelitian (Nasri *et al.*, 2015), didapatkan efek suhu terhadap aktivitas enzim protease yaitu pada suhu 50°C dengan dilakukan uji pada rentan suhu (30°C-80°C). Pada penelitian (Khaled *et al.*, 2011), didapatkan efek suhu terhadap aktivitas enzim protease yaitu pada suhu 40°C dengan dilakukan uji pada rentan suhu (25°C-70°C). Pada penelitian (Saranya *et al.*, 2018), didapatkan efek suhu terhadap aktivitas enzim protease yaitu pada suhu 30°C dengan dilakukan uji pada rentan suhu (20°C-80°C).

3.5.4 Pengaruh Inhibitor Terhadap Aktivitas Enzim Protease Dari Limbah Hasil Perikanan

Senyawa inhibitor adalah senyawa yang dapat mempengaruhi aktivitas enzim yang bertujuan agar aktivitas enzim protease dapat dihambat oleh senyawa inhibitor. Terdapat dua tipe inhibisi yaitu inhibisi kompetitif dan inhibisi non kompetitif (Soeka dan Sulistiani, 2017). Inhibitor kompetitif melakukan

penghambatan pada sisi aktif enzim dan bersifat sementara (Liu *et al.*, 2013).

Sedangkan inhibitor non kompetitif bekerja pada luar sisi aktif enzim dan bersifat tetap (Fujita *et al.*, 2011). Enzim protease memiliki beberapa inhibitor untuk menguji aktivitas inhibitor terhadap aktivitas enzim antara lain: EDTA (*Ethylenediaminetetraacetic acid*) yang memiliki target metalloprotease, PMSF (*Phenylmethylsulfonyl fluoride*); Benzamidine dan SBTI yang memiliki target serine protease (Bijina *et al.*, 2011). Berikut merupakan beberapa referensi inhibitor pada enzim protease yang berasal dari limbah hasil perikanan, dapat dilihat pada **Tabel 16**.

Tabel 16. Pengaruh Senyawa Inhibitor Terhadap Aktivitas Enzim Protease dari Limbah Hasil Perikanan

Sumber	Organ	Protease Inhibitor	Konsentrasi	Relative Activity (%)	Referensi
Ikan Lemuru (<i>Sardinella longiceps</i>)	Usus	Kontrol	-	100	Maruthiah <i>et al.</i> , 2013
		EDTA	5 mM	65	
		PMSF	5 mM	40	
Limbah Ikan	Jeroan	Kontrol	-	100	Saranya <i>et al.</i> , 2018
		PMSF	5 mM	20	
		EDTA	5 mM	98	
<i>Serranus scriba</i>	Jeroan	EDTA	5 mM	51,52	Nasri <i>et al.</i> , 2015
		PMSF	5 mM	38,56	
<i>Sardinella aurita</i>	Jeroan	PMSF	5 mM	100	Khaled <i>et al.</i> , 2011
		SBTI	5 mM	97	
		EDTA	5	100	

3.5.5 Pengaruh Ion Logam Terhadap Aktivitas Enzim Protease Dari Limbah Hasil Perikanan

Beberapa referensi pengaruh logam terhadap enzim protease yang berasal dari berbagai limbah hasil perikanan dapat dilihat pada **Tabel 17**.

Tabel 17. Pengaruh Ion Logam Terhadap Aktivitas Enzim Protease Dari Limbah Hasil Perikanan

Sumber	Logam	Konsentrasi	Relative Activity (%)	Referensi
Jeroan	Kontrol	-	100	

(Sardinella aurita)	Ca ²⁺	5 mM	100	Khaled <i>et al.</i> , 2011
	Mg ²⁺	5 mM	50	
	Zn ²⁺	5 mM	70	
	Mn ²⁺	5 mM	90	
	Cu ²⁺	5 mM	50	
	Ba ²⁺	5 mM	78	
	Na ⁺	5 mM	100	
	K ⁺	5 mM	100	
	Hg ²⁺	5 mM	40	
Jeroan (Serranus scriba)	Kontrol	-	100	Nasri <i>et al.</i> , 2015
	Na ⁺	5 mM	93,7	
	K ⁺	5 mM	92	
	Mg ²⁺	5 mM	89	
	Mn ²⁺	5 mM	98	
	Cu ²⁺	5 mM	48	
	Zn ²⁺	5 mM	110	
	Ca ²⁺	5 mM	80,3	
	Ba ²⁺	5 mM	61,7	
Hg ²⁺	5 mM	45		
Jeroan (Oncorhynchus Mykiss)	Kontrol	-	100	Adevari <i>et al.</i> , 2019
	Na ⁺	5 mM	93,52	
	K ⁺	5 mM	80,04	
	Ca ²⁺	5 mM	70,65	
	Cu ²⁺	5 mM	96,97	
	Zn ²⁺	5 mM	67,70	
	Mn ²⁺	5 mM	75,12	
	Ba ²⁺	5 mM	74,78	

Pada penelitian (Khaled *et al.*, 2011), Ca²⁺, Na⁺, K⁺ tidak berpengaruh terhadap aktivitas enzim protease. Aktivitas *aspartic* protease agak berpengaruh terhadap Mn²⁺, Ba²⁺, Zn²⁺ dan dihambat oleh Mg²⁺, Cu²⁺, Hg²⁺ sebesar 50%, 50%, 60%. Pada penelitian (Nasri *et al.*, 2015), enzim aktif pada sebagian ion logam yang diuji kecuali pada Cu²⁺ dan Hg²⁺. Aktivitas alkaline protease tidak berpengaruh terhadap Na⁺ dan K⁺, sedangkan Zn²⁺ menambah aktivitas enzim

sebesar 10%. Pada penelitian (Andevari *et al.*, 2019), hampir sebagian besar ion logam menghambat aktivitas enzim kecuali Cu^{2+} dan Na^+ . Sedangkan Zn^{2+} menghambat aktivitas enzim sebesar 32,30%. Ditemukannya persamaan pada penelitian (Khaled *et al.*, 2011) dan (Nasri *et al.*, 2015), dimana Cu^{2+} dan Hg^{2+} menghambat aktivitas enzim dan Na^+ dan K^+ tidak berpengaruh terhadap aktivitas enzim.

Ion logam dapat berperan menaikkan nilai aktivitas dari enzim protease atau yang sering disebut aktivator. Hal ini dilakukan dengan ion logam menjadi komponen dalam sisi aktif enzim, memperbesar aktivitas enzim, merubah konstanta dari reaksi enzimatik, mengganti ion yang tidak bekerja pada sisi aktif enzim protease. Namun, pada kondisi yang lain ion logam dapat berperan sebagai penghambat aktivitas enzim atau inhibitor (Fathimah dan Wardani, 2014). Sedangkan penghambatan aktivitas enzim oleh ion logam terjadi akibat ion logam menempel pada sisi aktif enzim sehingga enzim tidak dapat berikatan dengan substrat dan fungsi katalitik enzim tersebut akan terganggu (Uyar *et al.*, 2011).

3.6 Pemanfaatan Enzim Protease Dari Limbah Hasil Perikanan

Protease memiliki peran penting dalam bidang industri. Hal ini dikarenakan aplikasi enzim protease yang luas seperti dalam industri kulit dan deterjen, industri makanan dan farmasi dan juga dalam proses bioremediasi. Protease diproduksi di skala besar karena stabilitas, spesifisitas dan aktivitasnya yang tinggi dalam berbagai parameter fisik (Ramkumar *et al.*, 2016). Protease adalah enzim yang diterapkan secara luas di beberapa sektor industri dan bioteknologi. Selain itu, banyak penelitian yang memerlukan aplikasi dari enzim protease (Mótyán *et al.*, 2013). Lebih dari 60% dari produksi enzim industri di seluruh dunia adalah enzim proteolitik. 35 % diantaranya merupakan enzim protease tipe alkali (alkali protease). Alkali protease banyak digunakan di berbagai industri seperti industri

makanan, industri farmasi, industri deterjen, industri pembuatan keju, industri pembuatan bir, industri fotografi, industri daging, industri kosmetik dan kulit dan sebagainya (Synowiecki, 2010). Beberapa referensi dari pemanfaatan enzim protease dari berbagai sumber limbah hasil perikanan dapat dilihat pada **Tabel 18**.

Tabel 18. Pemanfaatan Enzim Protease Dari Limbah Hasil Perikanan

Sumber	Aplikasi	Referensi
Jeroan (<i>Tilapia mossambica</i>)	Sebagai peningkat kejernihan air	Gais dan Bhardwaj, 2019
Jeroan (<i>Euthynnus affinis</i>)	Sebagai bahan hidrolisat protein	Murthy <i>et al.</i> , 2018
Jeroan (<i>Catla catla</i>)	Sebagai bahan hidrolisat protein	Murthy <i>et al.</i> , 2018
Jeroan (<i>Oreochromis mossambicus</i>)	Sebagai bahan hidrolisat protein	Murthy <i>et al.</i> , 2018
Jeroan (<i>Red Snapper</i>)	Sebagai bahan <i>dehairing</i> pada industri kulit	Sabtecha <i>et al.</i> , 2014
Jeroan (<i>Red Snapper</i>)	Sebagai bahan <i>destaining</i>	Sabtecha <i>et al.</i> , 2014

4. PENUTUP

4.1 Kesimpulan

Kajian Pustaka ini membahas tentang penggunaan limbah hasil perikanan sebagai bahan pembuat enzim protease dan pemanfaatannya. Limbah merupakan buangan dari beberapa proses. Limbah hasil perikanan sendiri terdiri dari beberapa jenis, salah satunya limbah dari hasil proses pengolahan yang diperkirakan hampir 64 juta ton dihasilkan per tahun. Salah satu pemanfaatan dari limbah proses perikanan ini dapat dijadikan bahan pembuat enzim protease. Enzim protease merupakan enzim yang mewakili 65% penjualan di industri global. Enzim protease dari limbah hasil perikanan dihasilkan melalui tahap ekstraksi dan tahap purifikasi. Selain itu, didapatkan aktivitas enzim protease dari limbah hasil perikanan seperti pengaruh pH, pengaruh suhu, berat molekul, inhibitor protease dan pengaruh ion logam. Enzim protease dari limbah hasil perikanan dapat dimanfaatkan sebagai antara lain sebagai pelunak daging, sebagai bahan hidrolisat protein dan lain-lain.

4.2 Saran

1. Pemanfaatan limbah hasil perikanan sebagai bahan enzim protease tidak optimal jika dilihat dari sisi pemanfaatan limbah hasil perikanan yang bertujuan untuk meningkatkan nilai ekonomis. Dikarenakan, limbah hasil perikanan tidak begitu ekonomis dalam menghasilkan enzim protease jika dibandingkan dengan sumber yang lain seperti tanaman.
2. Perlu dilakukan penelitian lanjutan terkait sisi ekonomis dari pemanfaatan limbah hasil perikanan sebagai bahan penghasil enzim protease. Dikarenakan keterbatasan pembahasan dalam kajian pustaka ini.

DAFTAR PUSTAKA

- A. Mótyán, J., Tóth, F., & Tózsér, J. (2013). Research applications of proteolytic enzymes in molecular biology. *Biomolecules*, **3**(4), 923–942. <https://doi.org/10.3390/biom3040923>
- Abou-Elela, G. M., Ibrahim, H. A. H., Hassan, S. W., Abd-Elnaby, H., & El-Toukhy, N. M. K. (2011). Alkaline protease production by alkaliphilic marine bacteria isolated from Marsa-Matrouh (Egypt) with special emphasis on *Bacillus cereus* purified protease. *African Journal of Biotechnology*, **10**(22), 4631–4642. <https://doi.org/10.4314/ajb.v10i22>
- Agung, P., Putri, R. M. S., & Suhandana, M. (2011). Pemanfaatan limbah industri pengolahan ikan dan limbah lamun kering menjadi bahan pupuk organik padat berbasis silase. *Jurusan Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Ilmu Kelautan Dan Perikanan. Universitas Maritim Raja Ali Haji, Riau*, 1–10. <http://repository.umrah.ac.id/id/eprint/1233>
- Ahmad, M., Benjakul, S., Ovissipour, M., & Prodpran, T. (2011). Indigenous proteases in the skin of unicorn leatherjacket (*Alutherus monoceros*) and their influence on characteristic and functional properties of gelatin. *Food Chemistry*, **127**(2), 508–515. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.032>
- Ahuja, I., Dauksas, E., Remme, J. F., Richardsen, R., & Løes, A. K. (2020). Fish and fish waste-based fertilizers in organic farming – With status in Norway: A review. *Waste Management*, **115**, 95–112. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.07.025>
- Andevvari, G., Rezaei, M., Tabarsa, M., & Rustad, T. (2019). Extraction, partial purification and characterization of alkaline protease from rainbow trout (*Oncorhynchus Mykiss*) viscera. *Aquaculture*, **500**, 458–463. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.10.052>
- Annamalai, N., Rajeswari, M. V., & Balasubramanian, T. (2014). Extraction, purification and application of thermostable and halostable alkaline protease from *Bacillus alveayuensis* CAS5 using marine wastes. *Food and Bioprocess Technology*, **92**(4), 335–342. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2013.08.009>
- Ardianingsih, R. (2010). Penggunaan high performance liquid chromatography (HPLC) dalam proses analisa deteksi ion. *Jurnal LAPAN*, **10**(4), 101–104.
- Arvanitoyannis, I., & Kassaveti, A. (2011). Fish industry waste: Treatments, environmental impacts, current and potential uses. *International Journal of Food Science and Technology*, **43**(4), 726–745. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.01513.x>
- Bhattacharya, L., & Rohrer, J. S. (2012). *Applications of ion chromatography for pharmaceutical and biological products*. John Wiley & Sons.
- Bijina, B., Chellappan, S., Basheer, S. M., Elyas, K. K., Bahkali, A. H., & Chandrasekaran, M. (2011). Protease inhibitor from *Moringa oleifera* leaves: Isolation, purification, and characterization. *Process Biochemistry*, **46**(12), 2291–2300. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.09.008>
- Chaijaroen, T., & Thongruang, C. (2016). Extraction, characterization and activity of digestive enzyme from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) viscera waste. *International Food Research Journal*, **23**(4), 1432–1438.

Chellappan, S., Jasmin, C., Basheer, S. M., Kishore, A., Elyas, K. K., Bhat, S. G., & Chandrasekaran, M. (2011). Characterization of an extracellular alkaline serine protease from marine *Engyodontium album* BTMFS10. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **38**(6), 743–752.
<https://doi.org/10.1007/s10295-010-0914-3>

Choe, U., Mustafa, A. M., Lin, H., Choe, U., & Sheng, K. (2020). Anaerobic co-digestion of fish processing waste with a liquid fraction of hydrothermal carbonization of bamboo residue. *Bioresource Technology*, **297**, 122542.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122542>

Cui, L. Y., Hu, Y., Zeng, R. C., Yang, Y. X., Sun, D. D., Li, S. Q., Zhang, F., & Han, E. H. (2017). New insights into the effect of Tris-HCl and Tris on corrosion of magnesium alloy in presence of bicarbonate, sulfate, hydrogen phosphate and dihydrogen phosphate ions. *Journal of Materials Science and Technology*, **33**(9), 971–986.
<https://doi.org/10.1016/j.jmst.2017.01.005>

Dake, M. S., & Kumar, G. (2012). Partial purification and characterization of fructosyltransferase from *Aureobasidium Pullulans*. *International Journal of Science, Environment*, **1**(2), 88–98.

Djunaidah, I. S. (2017). Level of fish consumption in Indonesia: irony in the nautical country. *Jurnal Penyuluhan Perikanan Dan Kelautan*, **11**(1), 12–24.

dos Santos Aguilar, J. G., & Sato, H. H. (2018). Microbial proteases: Production and application in obtaining protein hydrolysates. *Food Research International*, **103**, 253–262.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.10.044>

Dumay, J., Bernardi, C., Guthrie, J., & Demartini, P. (2016). Integrated reporting: A structured literature review. *Accounting Forum*, **40**(3), 166–185.
<https://doi.org/10.1016/j.acfor.2016.06.001>

Elfian, E., Mappiratu, M., & Razak, A. R. (2017). Penggunaan enzim protease kasar getah biduri untuk produksi cita rasa ikan teri (*Stolephorus Heterolobus*). *Kovalen*, **3**(2), 122.
<https://doi.org/10.22487/j24775398.2017.v3.i2.8718>

Fadhil, A. B., Ahmed, A. I., & Salih, H. A. (2017). Production of liquid fuels and activated carbons from fish waste. *Fuel*, **187**, 435–445.
<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2016.09.064>

FAO. (2011). *Global Food losses and Food waste. Save Food Congress. May, 1*.
<http://www.unep.org/wed/2013/quickfacts>

Fathimah, A. N., & Wardani, A. K. (2014). Ekstraksi dan karakterisasi enzim protease dari daun kelor (*Moringa oliefera Lamk.*). *Jurnal Teknologi Pertanian*, **15**(3), 191–200.

Febrian, M. B., Setiadi, Y., Setiawan, D., Mulyati, T. S., & Suherma, N. (2015). Analisis kualitas pemisahan skandium-46 dan titanium menggunakan kolom silika gel. *Issn 0211-3128*, 141–147.

Fekete, S., Beck, A., Veuthey, J. L., & Guillaume, D. (2015). Ion-exchange chromatography for the characterization of biopharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **113**, 43–55.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.02.037>

Fujita, K. I., Sugiyama, M., Akiyama, Y., Ando, Y., & Sasaki, Y. (2011). The small-molecule tyrosine kinase inhibitor nilotinib is a potent noncompetitive inhibitor of the SN-38 glucuronidation by human UGT1A1. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, **67**(1), 237–241.
<https://doi.org/10.1007/s00280-010-1445-3>

Ge, Y. H., Chen, Y. Y., Zhou, G. S., Liu, X., Tang, Y. P., Liu, R., Liu, P., Li, N., Yang, J., Wang, J., Yue, S. J., Zhou, H., & Duan, J. A. (2018). A novel

- antithrombotic protease from marine worm *sipunculus nudus*. *International Journal of Molecular Sciences*, **19**(10), 1–17.
<https://doi.org/10.3390/ijms19103023>
- Geethanjali, S., & Subash, A. (2012). Isolation and purification of protease from *labeo rohita* viscera. *55*(June), 2012.
- Ghaly, A. E., Ramakrishnan, V. V., Brooks, M. S., Budge, S. M., & Dave, D. (2013). Fish processing wastes as a potential source of proteins, amino acids and oils: A critical review. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*, **5**(4), 107–129.
<https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000110>
- Ghais, S. Al, & Bhardwaj, V. (2019). Utilization of fish viscera for protease production and used for digestion of waste in the pond. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, **7**(3), 112–115.
- Hamza. T.A. (2017). Bacterial protease enzyme: Safe and good alternative for industrial and commercial use. *International Journal of Chemical and Biomolecular Science*, **3**(1), 1–10.
<http://www.aiscience.org/journal/ijcbsh><http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>
- Hepsibha Balraj, T., Palani, S., & Arumugam, G. (2014). Influence of gunapaselam, a liquid fermented fish waste on the growth characteristics of *Solanum melongena*. Available Online [Www.Jocpr.Com](http://www.jocpr.com) *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, **6**(12), 58–66. www.jocpr.com
- Husin, N., M.M.Kamal, S., T.Chuan, L., F.Muhammad, N., & Jusoh, N. (2012). Comparison of microbial growth on fish waste peptones from different hydrolysis methods. *International Proceedings of Chemical, Biological and Environmental Engineering*, **32**(1), 12–16.
<https://doi.org/10.7763/IPCBE>
- Illera-Vives, M., Seoane Labandeira, S., Brito, L. M., López-Fabal, A., & López-Mosquera, M. E. (2015). Evaluation of compost from seaweed and fish waste as a fertilizer for horticultural use. *Scientia Horticulturae*, **186**, 101–107.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.02.008>
- Jellouli, K., Ghorbel-Bellaaj, O., Ayed, H. Ben, Manni, L., Agrebi, R., & Nasri, M. (2011). Alkaline-protease from *Bacillus licheniformis* MP1: Purification, characterization and potential application as a detergent additive and for shrimp waste deproteinization. *Process Biochemistry*, **46**(6), 1248–1256.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.02.012>
- Jeyanthi, L. R., Sharmila, S., Das, M. P., & Seshiah, C. (2014). Extraction and purification of carotenoids from vegetables. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, **6**(4), 594–598.
- Kafle, G. K., & Kim, S. H. (2012). Evaluation of the biogas productivity potential of fish waste: A lab scale batch study. *Journal of Biosystems Engineering*, **37**(5), 302–313.
<https://doi.org/10.5307/jbe.2012.37.5.302>
- Kandasamy, N., Velmurugan, P., Sundarvel, A., Jonnalagadda Raghava, R., Bangaru, C., & Palanisamy, T. (2012). Eco-benign enzymatic dehairing of goatskins utilizing a protease from a *Pseudomonas fluorescens* species isolated from fish visceral waste. *Journal of Cleaner Production*, **25**, 27–33.
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2011.12.007>
- Kannan, S., Garipey, Y., & Raghavan, G. S. V. (2017). Optimization and characterization of hydrochar produced from microwave hydrothermal carbonization of fish waste. *Waste Management*, **65**, 159–168.
<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.04.016>
- Kementerian Kelautan dan Perikanan. (2018). *Produktivitas Perikanan Indonesia*.

1–43.

https://doi.org/10.1007/978-3-642-21501-8_59

Ketnawa, S., Benjakul, S., Ling, T. C., Martínez-Alvarez, O., & Rawdkuen, S. (2013). Enhanced recovery of alkaline protease from fish viscera by phase partitioning and its application. *Chemistry Central Journal*, **7**(1), 1–9.

<https://doi.org/10.1186/1752-153X-7-79>

Khaled, H. Ben, Ghorbel-Bellaaj, O., Hmidet, N., Jellouli, K., Ali, N. E. H., Ghorbel, S., & Nasri, M. (2011). A novel aspartic protease from the viscera of Sardinelle (*Sardinella aurita*): Purification and characterisation. *Food Chemistry*, **128**(4), 847–853.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.104>

Khantaphant, S., & Benjakul, S. (2010). Purification and characterization of trypsin from the pyloric caeca of brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*). *Food Chemistry*, **120**(3), 658–664.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.098>

Khoddami, A., Ariffin, A., Bakar, J., & Ghazali, H. (2012). Quality and fatty acid profile of the oil extracted from fish waste (head, intestine and liver) (*Euthynnus affinis*). *African Journal of Biotechnology*, **11**(7), 1683–1689.

<https://doi.org/10.5897/ajb10.1699>

Knudsen, L. V., Laplante-Lévesque, A., Jones, L., Preminger, J. E., Nielsen, C., Lunner, T., Hickson, L., Naylor, G., & Kramer, S. E. (2012). Conducting qualitative research in audiology: A tutorial. *International Journal of Audiology*, **51**(2), 83–92.

<https://doi.org/10.3109/14992027.2011.606283>

Lamas, D. L., Yeannes, M. I., & Massa, A. E. (2017). Alkaline trypsin from the viscera and heads of *Engraulis anchoita*: Partial purification and characterization. *Biotechnologia*, **98**(2), 103–112.

<https://doi.org/10.5114/bta.2017.68309>

Lario, L. D., Chaud, L., Almeida, M. das G., Converti, A., Durães Sette, L., & Pessoa, A. (2015). Production, purification, and characterization of an extracellular acid protease from the marine Antarctic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* L7. *Fungal Biology*, **119**(11), 1129–1136.

<https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.08.012>

Liu, Q., Xu, C., Kirubakaran, S., Zhang, X., Hur, W., Liu, Y., Kwiatkowski, N. P., Wang, J., Westover, K. D., Gao, P., Ercan, D., Niepel, M., Thoreen, C. C., Kang, S. A., Patricelli, M. P., Wang, Y., Tupper, T., Altabef, A., Kawamura, H., ... Gray, N. S. (2013). Characterization of Torin2, an ATP-competitive inhibitor of mTOR, ATM, and ATR. *Cancer Research*, **73**(8), 2574–2586.

<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-1702>

Luhur, E. S., Zulham, A., & Haryadi, J. (2016). *Potential use of fisheries waste in Banda Aceh*. 37–44.

Ma, G., Yang, W., Mariga, A. M., Fang, Y., Ma, N., Pei, F., & Hu, Q. (2014). Purification, characterization and antitumor activity of polysaccharides from *Pleurotus eryngii* residue. *Carbohydrate Polymers*, **114**, 297–305.

<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.07.069>

Maghsoodi, V., Kazemi, A., Nahid, P., Yaghmaei, S., & Sabzevari, M. A. (2013). Alkaline protease production by immobilized cells using *B. licheniformis*. *Scientia Iranica*, **20**(3), 607–610.

<https://doi.org/10.1016/j.scient.2013.01.007>

Mahboob, S. (2015). Isolation and characterization of collagen from fish waste material- skin, scales and fins of *Catla catla* and *Cirrhinus mrigala*. *Journal of Food Science and Technology*, **52**(7), 4296–4305.

<https://doi.org/10.1007/s13197-014-1520-6>

- Mander, P., Cho, S. S., Simkhada, J. R., Choi, Y. H., & Yoo, J. C. (2011). A low molecular weight chymotrypsin-like novel fibrinolytic enzyme from *Streptomyces* sp. CS624. *Process Biochemistry*, **46**(7), 1449–1455. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.03.016>
- Marcuschi, M., Espósito, T. S., Machado, M. F. M., Hirata, I. Y., Machado, M. F. M., Silva, M. V., Carvalho, L. B., Oliveira, V., & Bezerra, R. S. (2010). Purification, characterization and substrate specificity of a trypsin from the Amazonian fish tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **396**(3), 667–673. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.04.155>
- Maruthiah, T., Esakkiraj, P., Prabakaran, G., Palavesam, A., & Immanuel, G. (2013). Purification and characterization of moderately halophilic alkaline serine protease from marine *Bacillus subtilis* AP-MSU 6. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, **2**(2), 116–119. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2013.03.001>
- Maruthiah, T., Immanuel, G., & Palavesam, A. (2017). Purification and characterization of halophilic organic solvent tolerant protease from *Marine Bacillus* sp. APCMST-RS7 and its antioxidant potentials. *Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences*, **87**(1), 207–216. <https://doi.org/10.1007/s40011-015-0603-0>
- Melfianora. (2019). Penulisan karya tulis ilmiah dengan studi literatur. *Open Science Framework*, 1–3. osf.io/efmc2
- Mo, W. Y., Man, Y. B., & Wong, M. H. (2018). Use of food waste, fish waste and food processing waste for China's aquaculture industry: Needs and challenge. *Science of the Total Environment*, **613–614**, 635–643. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.321>
- Mourão, C. B. F., & Schwartz, E. F. (2013). Protease inhibitors from marine venomous animals and their counterparts in terrestrial venomous animals. *Marine Drugs*, **11**(6), 2069–2112. <https://doi.org/10.3390/md11062069>
- Murthy, L. N., Phadke, G. G., Unnikrishnan, P., Annamalai, J., Joshy, C. G., Zynudheen, A. A., & Ravishankar, C. N. (2018). Valorization of fish viscera for crude proteases production and its use in bioactive protein hydrolysate preparation. *Waste and Biomass Valorization*, **9**(10), 1735–1746. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-9962-5>
- Mustopa, A. Z., Melki, & Kusumawati, I. S. (2012). Isolasi dan identifikasi awal senyawa inhibitor RNA helikasi virus hepatitis C dari ekstrak buah mangrove *Avicennia Marina*. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan*, **15**(1), 105–117.
- Muthulakshmi, C., Gomathi, D., Kumar, D. G., Ravikumar, G., Kalaiselvi, M., & Uma, C. (2011). Production, purification and characterization of protease by *Aspergillus flavus* under solid state fermentation. *Jordan Journal of Biological Sciences*, **4**(3), 137–148.
- Jisha, V., B. Smitha, R., Pradeep, S., Sreedevi, S., N. Unni, K., Sajith, S., Priji, P., Sarath Josh, M., & Benjamin, S. (2013). Versatility of microbial proteases. *Advances in Enzyme Research*, **1**(03), 39–51. <https://doi.org/10.4236/aer.2013.13005>
- Nadeem, M., Qazi, J. I., Syed, Q., & Gulsher, M. (2013). Purification and characterization of an alkaline protease from *Bacillus licheniformis* UV-9 for detergent formulations. *Songklanakar Journal of Science and Technology*, **1–48**.
- Nasri, R., Abed, H., Karra-châabouni, M., Nasri, M., & Bougatef, A. (2015). Digestive alkaline proteinases from *Serranus scriba* viscera: Characteristics,



application in the extraction of carotenoproteins from shrimp waste, and evaluation in laundry commercial detergents. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, **4**(3), 355–361.

<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.05.001>

Nasri, R., Younes, I., Lassoued, I., Ghorbel, S., Ghorbel-Bellaaj, O., & Nasri, M. (2011). Digestive alkaline proteases from *Zosterisessor ophiocephalus*, *Raja clavata* and *Scorpaena scrofa*: characteristics and application in chitin extraction. *Journal of Amino Acids*, 1–9.

<https://doi.org/10.4061/2011/913616>

Nasution, U. J., Wijaya, S. M., Wibisana, A., Safarrida, A., Rachmawati, I., Puspitasari, D. J., Naim, S., Mahsunah, A. H., Wulyoadi, S., & Suyanto, S. (2018). Pemurnian enzim Sefalosporin-C asilase dan optimasi proses kromatografi penukar ion. *Jurnal Bioteknologi & Biosains Indonesia (JBBI)*, **5**(2), 119.

<https://doi.org/10.29122/jbbi.v5i2.2902>

Nges, I. A., Mbatia, B., & Björnsson, L. (2012). Improved utilization of fish waste by anaerobic digestion following omega-3 fatty acids extraction. *Journal of Environmental Management*, **110**, 159–165.

<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.06.011>

Nursa'adah, E., Liliarsari, L., & Mudzakir, A. (2020). Designing learning sequence metallic bonding concept through model of educational reconstruction framework. *Jurnal Kimia Dan Pendidikan*, **5**(2), 101.

<https://doi.org/10.30870/educhemia.v5i2.8423>

Octarya, Z., Syukur, S., & Purwati, E. (2013). Purifikasi parsial enzim ekstraseluler (*Anoxybacillus* sp.) yang diisolasi dari sumber air panas Bukit Kili Solok serta aplikasinya untuk menghidrolisis limbah berserat. *Jurnal Natur Indonesia*, **15**(2), 106.

<https://doi.org/10.31258/jnat.15.2.106-114>

Padmapriya, B., Rajeswari, T., Nandita, R., & Raj, F. (2012). Production and purification of alkaline serine protease from marine *Bacillus* species and its application in detergent industry. *European Journal of Applied Sciences*, **4**(1), 21–26.

Pamaya, D., Muchlissin, S. I., Darmawati, S., & Ethica, S. N. (2018). Isolasi bakteri penghasil enzim protease *Bacillus Amyloliquefaciens* Irod2 pada oncom merah pasca fermentasi 48 Jam. *Seminar Nasional Edusainstek, October*, 40–46.

Pant, G., Prakash, A., Pavani, J. V. P., Bera, S., Deviram, G. V. N. S., Kumar, A., Panchpuri, M., & Prasuna, R. G. (2015). Production, optimization and partial purification of protease from *Bacillus subtilis*. *Journal of Taibah University for Science*, **9**(1), 50–55.

<https://doi.org/10.1016/j.jtusci.2014.04.010>

Pautasso, M. (2013). Ten simple rules for writing a literature review. *PLoS Computational Biology*, **9**(7), 7–10.

<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003149>

Pezeshk, S., Ojagh, S. M., Rezaei, M., & Shabanpour, B. (2017). Antioxidant and antibacterial effect of protein hydrolysis of yellowfin tuna waste on flesh quality parameters of minced silver carp. *Journal of Genetic Resources*, **3**(2), 103–112.

<https://doi.org/10.22080/jgr.2018.13611.1091>

Prastowo, A. (2012). Metode penelitian kualitatif dalam perspektif rancangan penelitian. Yogyakarta: Al-Ruzz media

Prihantini, N. N., Khusniati, T., Bintang, M., & Kunci, K. (2013). Purifikasi parsial dan karakterisasi β -Galactosidase dari *Lactobacillus Plantarum* Strain D-210.

- Journal Kedokteran Yarsi*, **21**(1), 14–26.
- Prihanto, A. A., Nurdiani, R., & Bagus, A. D. (2019). Production and characteristics of fish protein hydrolysate from parrotfish (*Chlorurus sordidus*) head. *PeerJ*, **12**(12), 1–16. <https://doi.org/10.7717/peerj.8297>
- Prihanto, A. A., Nursyam, H., Jatmiko, Y. D., & Hayati, R. L. (2019). Isolation, partial purification and characterization of protease enzyme from the head of Nile tilapia fish (*Oreochromis niloticus*). *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, **23**(3), 257–262. <https://doi.org/10.21608/ejabf.2019.70436>
- Ramadhani, P., M.G.I, R., & S, P. (2015). Produksi enzim protease dari *A. Niger* Pam18a dengan variasi pH dan waktu inkubasi. *Jurnal Akademika Biologi*, **4**(2), 25–34.
- Ramkumar, A., Sivakumar, N., & Victor, R. (2016). Fish waste-potential low cost substrate for bacterial protease production: A brief review. *The Open Biotechnology Journal*, **10**(1), 335–341. <https://doi.org/10.2174/1874070701610010335>
- Rebah, F. Ben, & Miled, N. (2013). Fish processing wastes for microbial enzyme production: a review. *3 Biotech*, **3**(4), 255–265. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0099-8>
- Rengasamy, G., Jebaraj, D. M., Veeraraghavan, V. P., & Mohan, S. K. (2016). Characterization, partial purification of alkaline protease from intestinal waste of *scomberomorus guttatus* and production of laundry detergent with alkaline protease additive. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, **50**(2), S59–S67. <https://doi.org/10.5530/ijper.50.2.19>
- Rizal, M. (2011). Analisis pengelolaan persampahan perkotaan (Studi Kasus Pada Kelurahan Boya Kecamatan Banawa Kabupaten Donggala). *SMARTek*, **9**, 155–172.
- Sabtecha, B., Jayapriya, J., & Tamilselvi, A. (2014). Extraction and characterization of proteolytic enzymes from fish visceral waste: Potential applications as destainer and dehairing agent. *International Journal of ChemTech Research*, **6**(10), 4504–4510.
- Sajuthi, D., Suparto, I., & Praira, W. (2011). Purifikasi dan pencirian enzim protease fibrinolitik dari ekstrak jamur merang. *MAKARA*, **14**(2), 145–150.
- Salehi, M., Aghamaali, M. R., Sajedi, R. H., Asghari, S. M., & Jorjani, E. (2017). Purification and characterization of a milk-clotting aspartic protease from *Withania coagulans* fruit. *International Journal of Biological Macromolecules*, **98**, 847–854. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.02.034>
- Saranya, R., Jayapriya, J., & A., T. S. (2018). Purification, characterization, molecular modeling and docking study of fish waste protease. *International Journal of Biological Macromolecules*, **118**, 569–583. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.119>
- Savitha, S., Sadhasivam, S., Swaminathan, K., & Lin, F. H. (2011). Fungal protease: Production, purification and compatibility with laundry detergents and their wash performance. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, **42**(2), 298–304. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2010.05.012>
- Senphan, T., Benjakul, S., & Kishimura, H. (2015). Purification and characterization of trypsin from hepatopancreas of Pacific white shrimp. *Journal of Food Biochemistry*, **39**(4), 388–397. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12147>
- Sevinc, N., & Demirkan, E. (2011). Production of protease by *Bacillus* sp. N-40 isolated from soil and its enzymatic properties. *J. Biol. Environ. Sci*, **5**(14), 95–

- 103.
- Shahidi, F., Varatharajan, V., Peng, H., & Senadheera, R. (2019). Utilization of marine by-products for the recovery of value-added products. *Journal of Food Bioactives*, **6**, 10–61.
<https://doi.org/10.31665/jfb.2019.6184>
- Shankar, S., Rao, M., & Laxman, R. S. (2011). Purification and characterization of an alkaline protease by a new strain of *Beauveria* sp. *Process Biochemistry*, **46**(2), 579–585.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.10.013>
- Sholihati, A. M., Baharuddin, M., & Santi. (2015). Produksi dan uji aktivitas enzim selulase dari *Bacillus subtilis*. *Al-Kimia*, **3**(2), 78–90.
<http://103.55.216.56/index.php/al-kimia/article/view/1672>
- Silaswati, D. (2018). Pentingnya penentuan topik dalam penulisan karya ilmiah pada bidang ilmu akuntansi. *Jurnal Ilmiah Akuntansi*, **9**, 81–88.
- Singh, A., & Benjakul, S. (2018). Proteolysis and its control using protease inhibitors in fish and fish products: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **17**(2), 496–509.
<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12337>
- Soeka, Y. S., & Sulistiani, S. (2017). Karakterisasi enzim protease dari bakteri *Stenotrophomonas* sp. asal Gunung Bromo, Jawa Timur. *Berita Biologi*, **16**(2).
<https://doi.org/10.14203/beritabiologi.v16i2.2940>
- Souza, P. M., Werneck, G., Aliakbarian, B., Siqueira, F., Ferreira Filho, E. X., Perego, P., Converti, A., Magalhães, P. O., & Junior, A. P. (2017). Production, purification and characterization of an aspartic protease from *Aspergillus foetidus*. *Food and Chemical Toxicology*, **109**, 1103–1110.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.03.055>
- Sriket, C., Benjakul, S., Visessanguan, W., Hara, K., Yoshida, A., & Liang, X. (2012). Low molecular weight trypsin from hepatopancreas of freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*): Characteristics and biochemical properties. *Food Chemistry*, **134**(1), 351–358.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.173>
- Suhito, I. R. (2016). Ekstraksi, purifikasi dan karakterisasi alkalin protease dari limbah buah naga merah. *SKRIPSI, Universitas Surabaya, Surabaya, April*, 1–61.
- Sulistiyarsi, A., Pujiati, & Ardhi, M. W. (2016). Pengaruh konsentrasi dan lama inkubasi terhadap kadar protein crude enzim selulase dari kapang *Aspergillus niger*. *Proceeding Biology Education Conference*, **13**(1), 781–786.
- Suptijah, P. (2010). *Ekstraksi Protease Dari Limbah Ikan Tuna*.
- Sutrisno, H. (2016). Trik-trik penelusuran artikel jurnal nasional dan internasional berbasis lembaga indeks nasional dan internasional. *Juridik Kimia*, **21**(1), 4–6.
- Syahrir, M., Kantun, W., & Cahyono, I. (2020). Kinerja enzim pencernaan ikan nila salin (*Oreochromis niloticus*) berdasarkan lingkungan budidaya. *Fisheries Journal*, **2**(2), 78–87.
- Synowiecki, J. (2010). Some applications of thermophiles and their enzymes for protein processing. *African Journal of Biotechnology*, **9**(42), 7020–7025.
<https://doi.org/10.4314/ajb.v9i42>
- Uyar, F., Porsuk, I., Kizil, G., & Yilmaz, E. I. (2011). Optimal conditions for production of extracellular protease from newly isolated *Bacillus cereus* strain CA15. *EurAsian Journal of Biosciences*, **9**, 1–9.
<https://doi.org/10.5053/ejobios.2011.5.0.1>
- Vannabun, A., Ketnawa, S., Phongthai, S., Benjakul, S., & Rawdkuen, S. (2014).

Characterization of acid and alkaline proteases from viscera of farmed giant catfish. *Food Bioscience*, **6**, 9–16.

<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2014.01.001>

Wulandari, L. (2011). Kromatografi lapis tipis. In *Taman Kampus Presindo*.

Xu, H., Yao, N., Xu, H., Wang, T., Li, G., & Li, Z. (2013). Characterization of the interaction between eupatorin and bovine serum albumin by spectroscopic and molecular modeling methods. *International Journal of Molecular Sciences*, **14**(7), 14185–14203.

<https://doi.org/10.3390/ijms140714185>

Yang, W., Pei, F., Shi, Y., Zhao, L., Fang, Y., & Hu, Q. (2012). Purification, characterization and anti-proliferation activity of polysaccharides from *Flammulina velutipes*. *Carbohydrate Polymers*, **88**(2), 474–480.

<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.12.018>

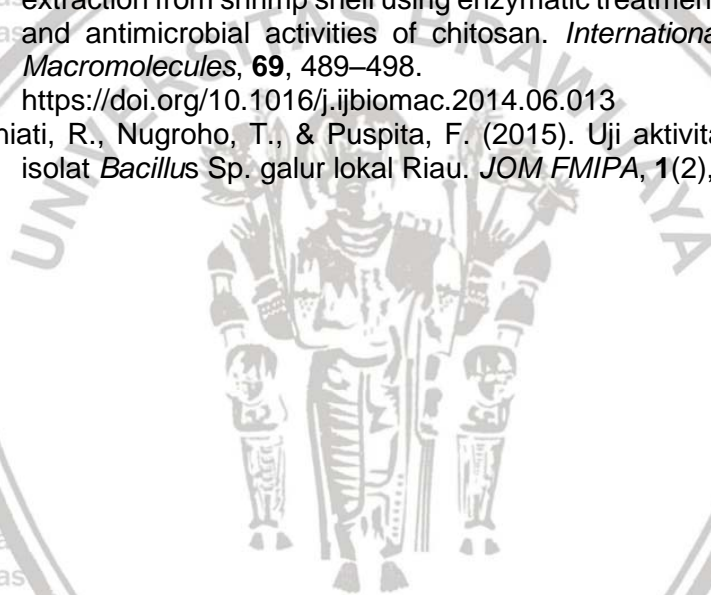
Yoshida, A., Ohta, M., Kuwahara, K., Cao, M. J., Hara, K., & Osatomi, K. (2015). Purification and characterization of cathepsin B from the muscle of horse mackerel *trachurus japonicus*. *Marine Drugs*, **13**(11), 6550–6565.

<https://doi.org/10.3390/md13116550>

Younes, I., Hajji, S., Frachet, V., Rinaudo, M., Jellouli, K., & Nasri, M. (2014). Chitin extraction from shrimp shell using enzymatic treatment: Antitumor, antioxidant and antimicrobial activities of chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, **69**, 489–498.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.06.013>

Yuniati, R., Nugroho, T., & Puspita, F. (2015). Uji aktivitas enzim protease dari isolat *Bacillus* Sp. galur lokal Riau. *JOM FMIPA*, **1**(2), 116–122.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Kerangka

Judul : **Produksi Enzim Protease Dari Limbah Hasil Perikanan dan Pemanfaatannya**

1. Latar Belakang

- Jumlah produksi dan konsumsi hasil perikanan di Indonesia.
- Permasalahan limbah dari hasil perikanan.
- Pemanfaatan limbah hasil perikanan.
- Pengertian enzim protease.
- Sumber enzim protease.
- Pemanfaatan enzim protease.

2. Tujuan Kajian Pustaka

- Untuk memberikan informasi terkait proses produksi enzim protease dari limbah hasil perikanan dan pemanfaatannya.

3. Metode Kajian Pustaka

- Metode yang digunakan yaitu *narrative review*.
- Tahapan pembuatan *review* terdiri dari 4 tahap yaitu: penentuan topik, pencarian artikel, analisis artikel dan penulisan *review*.
- Penulisan *review* dilakukan sesuai pedoman penulisan FPIK

4. Hasil Kajian Pustaka

Bahasan yang akan ditulis pada bab ini antara lain sebagai berikut:

- Pengertian limbah.
- Enzim protease (sumber dan kandungan).
- Ekstraksi enzim protease (ekstraksi dan purifikasi)

- Enzim protease dari limbah hasil perikanan (ekstraksi, kandungan dan jenis).
- Pemanfaatan enzim protease dari limbah hasil perikanan.

