

KARAKTERISASI ENZIM KATEPSIN DARI IKAN PATIN (*Pangasius sp*)

Muhammad Zakiyul Fikri, Ima Wijayanti, Nani Nur'aenah, Safrina Dyah Hardiningtyas,
Elizabeth Juleni Tapotubun

Departemen Teknologi Hasil Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, IPB

Abstrak

Enzim katepsin merupakan enzim penting yang berperan dalam proses pelunakan daging ikan selama proses kemunduran mutu. Aktivitas enzim ini sangat berpengaruh terhadap proses kemunduran mutu ikan. Oleh karena itu, perlu diketahui karakteristik enzim tersebut dalam proses kemunduran mutu sehingga dapat mengambil langkah yang tepat dalam penanganan dan pengolahan ikan. Tujuan penelitian ini adalah mengekstrak enzim katepsin dari ikan patin dan menentukan karakter enzim katepsin yang berasal dari ikan patin. Penelitian ini dilakukan dua tahap yaitu ekstraksi enzim kasar dan pengendapan dengan ammonium sulfat. Hasil penelitian ekstrak kasar (*crude ekstrak*) enzim katepsin menunjukkan aktivitas spesifik 0,457 U/mg, enzim tersebut dapat diendapkan dengan menggunakan ammonium sulfat 60%. Pengendapan dengan menggunakan ammonium sulfat menghasilkan aktivitas spesifik 0,23 kali. Enzim katepsin mempunyai suhu optimum 50 °C dan pH optimum 6, konsentrasi substrat optimum 6% dengan nilai aktivitas 0,8167 U/ml. Berat molekul enzim katepsin kasar hasil SDS-PAGE 12,97-55,49 kDa dan berat molekul enzim yang diduga mempunyai aktivitas proteolitik pada analisis zymogram adalah 28,88 kDa.

Kata kunci : enzim, katepsin, karakteristik, ikan patin

PENDAHULUAN

Patin merupakan jenis ikan konsumsi air tawar asli Indonesia yang tersebar di sebagian wilayah Sumatera dan Kalimantan. Daging ikan patin memiliki kandungan kalori dan protein yang cukup tinggi, rasa dagingnya khas, enak, lezat dan gurih sehingga digemari oleh masyarakat. Ikan patin dinilai lebih aman untuk kesehatan karena kadar kolesterolnya rendah dibandingkan dengan daging hewan ternak. Selain itu ikan patin memiliki beberapa kelebihan lain, yaitu ukuran per individunya besar dan di alam panjangnya bisa mencapai 120 cm (Susanto dan Amri, 2002).

Menurut data statistik perikanan budidaya tahun 2001, produksi ikan patin (dari budidaya kolam, keramba dan jaring apung, serta sawah) adalah sebesar 11.118 ton. Produksi ikan patin naik menjadi 32.375 ton pada tahun 2005, tetapi pada tahun 2006 turun menjadi 31.490 ton (Anonim 2007). Berbagai tantangan yang dihadapi dalam pemasaran ikan patin hasil budidaya antara lain adalah adanya hambatan menyangkut mutu dan keamanan pangan. Hal ini disebabkan karena ikan patin seperti halnya sifat ikan pada umumnya yaitu cepat mengalami kemunduran mutu ikan.

Penurunan mutu ikan terjadi segera setelah ikan ditangkap atau mati. Kecepatan penurunan mutu dipengaruhi oleh banyak faktor, antara lain jenis kelamin, jenis ikan, ukuran ikan, kondisi lingkungan, perlakuan fisik, jumlah jasad renik, dan aktivitas enzim (Ridwansyah

2002). Salah satu jenis enzim yang berperan penting dalam proses kemunduran mutu ikan adalah enzim-enzim pengurai protein (enzim proteolitik) yang menguraikan protein menjadi pepton, polipeptida, dan asam-asam amino (Kreuzer 1965). Hidrolisis protein oleh suatu protease seperti katepsin calpain dan kolagenase dapat menyebabkan timbulnya akumulasi metabolit, perubahan citarasa, dan pelunakan tekstur, terbentuknya komponen volatile serta peningkatan jumlah bakteri yang akhirnya menimbulkan kebusukan.

Protease adalah enzim yang mampu menghidrolisis ikatan peptide pada protein. Enzim ini untuk melakukan aktivitasnya membutuhkan air sehingga dikelompokkan dalam kelas hidrolase (Rao *et al.* 1998). Secara umum protease dapat dibagi dalam dua golongan, yaitu proteinase dan peptidase. Berdasarkan sifat kimia dan sisi aktifnya dikenal empat golongan protease yaitu serin, sistein, aspartat dan metallo endopeptidase (Otto dan Schirmeister 1997). Sistein protease merupakan kelompok besar enzim, termasuk katepsin lisosomal dan calpain.

Katepsin ditemukan di lisosom serat daging dan di sel fagosit. Lisosom merupakan intraseluler organel yang banyak mengandung enzim hidrolitik dan berperan dalam pencernaan dalam sel. Katepsin adalah asam protease terletak di lisosom. Mereka mungkin terbebaskan ke kedua sitoplasma dan ruang intraselular sebagai konsekuensi dari gangguan lisosomal yang terjadi setelah kematian sel akibat penurunan pH (Duston 1983 *diacu dalam* Cheret 2007).

Beberapa tipe katepsin telah diidentifikasi dengan asam amino yang berbeda di sisi aktifnya. Katepsin B dan Katepsin L keduanya merupakan sistein proteinase yang kemungkinan paling penting dalam kemunduran tekstur daging (Aoki *et al.* 2000; Kolodziejska dan Sikorski 1996). Aktivitasnya berbeda-beda tiap fraksi daging dan spesies ikan. Aktivitas optimum dilaporkan pada suhu 40-50 °C dan aktivitasnya menurun dengan penurunan suhu. Katepsin secara umum bekerja pada pH 3-4 dan beberapa katepsin juga mempunyai aktivitas tinggi pada pH 6-6,5 (Aoki *et al.* 2000; Kolodziejska dan Sikorski 1996).

Aktivitas katepsin sangat berpengaruh terhadap tekstur daging ikan karena katepsin dapat menurunkan fleksibilitas (kekenyalan) sehingga daging ikan menjadi tidak elastic dan jaringan daging ikan melunak (lembek). Pelunakan daging ini merupakan salah satu sumber masalah pada industri surimi karena katepsin dapat menurunkan kemampuan pembentukan gel pada proses pembuatan surimi dari daging ikan akibat degradasi protein myofibril yang dapat mengurangi elastisitas dan kekuatan gel surimi. Jenis katepsin B, D, L dan H telah diketahui memiliki efek *gel softening* pada proses pembentukan gel surimi (Haard 2000).

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui karakterisasi dan purifikasi enzim katepsin dari ikan Patin dengan presipitasi ammonium sulfat.

METODE PENELITIAN

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan terdiri dari bahan utama berupa ikan patin dalam keadaan *post-rigor*, bahan-bahan untuk ekstraksi kasar (buffer Tris HCl 0,1 M pH 7,4), presipitasi (ammonium sulfat teknis), uji aktivitas katepsin (hemoglobin, buffer tris HCl 0,1 M pH 7,4, tirosin, aquades, TCA 5%, folin, HCl 1 N), uji kadar protein (pereaksi Bradford, *bovine serum albumin*). Alat yang digunakan antara lain incubator, sentrifuse suhu dingin, spektrofotometer, pH meter, kertas saring whatman no.1, tabung reaksi, dan erlenmeyer.

Ekstraksi Katepsin Kasar

Ekstraksi dilakukan dengan presipitasi sampel untuk memperoleh ekstrak kasar katepsin dengan cara ikan dimatikan, kemudian daging ikan dibedah dengan cepat dan dicuci untuk menghilangkan darah. Tahapan ekstraksi katepsin kasar selanjutnya berdasarkan (Dinu *et al.* 2002).

Karakterisasi Suhu

Karakterisasi suhu dilakukan dengan melakukan variasi suhu inkubasi pada saat pengujian aktivitas katepsin dengan suhu 20, 30, 40, 50, 60 dan 70 °C. Pada waktu pengujian, hemoglobin sebagai substratnya dibuat dengan konsentrasi 2% pH 2. Aktivitas enzim katepsin kasar di ukur berdasarkan (Dinu *et al.* 2002).

Karakterisasi pH

Karakterisasi pH dilakukan dengan menggunakan substrat hemoglobin 2% yang diatur pada berbagai variasi pH yaitu 4, 5, 6, dan 7. Selain itu, buffer Tris HCl yang digunakan juga diatur pada variasi pH yang sama yaitu 4, 5, 6, dan 7. Aktivitas enzim katepsin kasar di ukur berdasarkan (Dinu *et al.* 2002).

Karakterisasi Konsentrasi Substrat

Karakterisasi konsentrasi substrat dilakukan dengan mengubah konsentrasi substrat hemoglobin dengan berbagai variasi konsentrasi yaitu: 3%, 4%, 5% dan 6% (b/v) pH 2. Aktivitas enzim katepsin kasar di ukur berdasarkan (Dinu *et al.* 2002).

Presipitasi Enzim Katepsin Kasar

Katepsin semi murni diperoleh dengan mengendapkan ekstrak kasar katepsin menggunakan ammonium sulfat dengan tingkat kejenuhan 50%, 60%, 70%, dan 80%. Amonium sulfat ditambahkan sedikit demi sedikit ke dalam supernatan dan selanjutnya

disentrifuse pada 12000xg selama 30 menit. Pelet yang diperoleh dari hasil sentrifuse dilarutkan dalam buffer Tris HCl 0,1 M pH 7,4.

Aktivitas Katepsin

Aktivitas proteolitik dari katepsin diuji menggunakan hemoglobin sebagai substratnya dengan konsentrasi 2% pH 2. Aktivitas katepsin diukur menurut metode Dinu *et al.* (2002).

Penentuan Konsentrasi Protein

Konsentrasi protein ditentukan dengan menggunakan metode Bradford dengan *bovin serum albumin* (BSA) sebagai standar (Bradford 1976).

Penentuan Berat Molekul dengan SDS-PAGE dan Zimogram

Penentuan berat molekul dilakukan dengan metode SDS-PAGE dengan komposisi gel penahan (*stacking gel*) sebesar 4% dan gel pemisah (gel akrilamid) sebesar 8%. Analisis SDS dan zimogram dilakukan berdasarkan (Laemmli 1970).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi Enzim Katepsin

Ekstraksi enzim katepsin kasar dari daging ikan patin dilakukan dengan mengambil bagian daging ikan yang sudah memasuki tahap *post-rigor*. Berdasarkan hasil penelitian Fentiana (2009), pada fase ini aktivitas katepsin berada pada aktivitas tertinggi dibandingkan pada fase-fase sebelumnya, sehingga diharapkan rendemen katepsin yang dihasilkan tinggi.

Selanjutnya daging ikan dilarutkan dalam akuades dengan perbandingan 1:1 dan dihomogenisasi. Menurut Carreno (2000), katepsin banyak ditemukan pada lisosom dan sel pagosit. Proses homogenisasi ini bertujuan untuk mengeluarkan enzim katepsin dari bagian lisosom dan mitokondria.

Hasil pemecahan sel dengan proses homogenisasi dipisahkan dengan sentrifugasi metode diferensial sebanyak tiga kali. Penelitian yang dilakukan Dinu *et al.* (2002) menyebutkan bahwa pada sentrifugasi tingkat pertama dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 600x g selama 10 menit. Sentrifugasi tingkat kedua dilakukan pada kecepatan 10000x g selama 10 menit. Sentrifugasi tahap ketiga dilakukan pada kecepatan 4000x g selama 10 menit.

Sentrifugasi metode differensiasi diawali dengan sentrifugasi tingkat pertama, dimana supernatan yang dihasilkan diambil untuk kemudian dilakukan sentrifugasi kedua pada kecepatan tinggi untuk memisahkan partikel yang berukuran sedang. Pelet yang dihasilkan pada sentrifugasi kedua dilarutkan dengan buffer Tris-HCl 0,1 M pH 7,4 dengan jumlah yang sama dengan akuades yang digunakan untuk proses homogenisasi.

disentrifuse pada 12000xg selama 30 menit. Pelet yang diperoleh dari hasil sentrifuse dilarutkan dalam buffer Tris HCl 0,1 M pH 7,4.

Aktivitas Katepsin

Aktivitas proteolitik dari katepsin diuji menggunakan hemoglobin sebagai substratnya dengan konsentrasi 2% pH 2. Aktivitas katepsin diukur menurut metode Dinu *et al.* (2002).

Penentuan Konsentrasi Protein

Konsentrasi protein ditentukan dengan menggunakan metode Bradford dengan bovin serum albumin (BSA) sebagai standar (Bradford 1976).

Penentuan Berat Molekul dengan SDS-PAGE dan Zimogram

Penentuan berat molekul dilakukan dengan metode SDS-PAGE dengan komposisi gel penahan (*stacking gel*) sebesar 4% dan gel pemisah (gel akrilamid) sebesar 8%. Analisis SDS dan zimogram dilakukan berdasarkan (Laemmli 1970).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi Enzim Katepsin

Ekstraksi enzim katepsin kasar dari daging ikan patin dilakukan dengan mengambil bagian daging ikan yang sudah memasuki tahap *post-rigor*. Berdasarkan hasil penelitian Fentiana (2009), pada fase ini aktivitas katepsin berada pada aktivitas tertinggi dibandingkan pada fase-fase sebelumnya, sehingga diharapkan rendemen katepsin yang dihasilkan tinggi.

Selanjutnya daging ikan dilarutkan dalam akuades dengan perbandingan 1:1 dan dihomogenisasi. Menurut Carreno (2000), katepsin banyak ditemukan pada lisosom dan sel pagosit. Proses homogenisasi ini bertujuan untuk mengeluarkan enzim katepsin dari bagian lisosom dan mitokondria.

Hasil pemecahan sel dengan proses homogenisasi dipisahkan dengan sentrifugasi metode diferensial sebanyak tiga kali. Penelitian yang dilakukan Dinu *et al.* (2002) menyebutkan bahwa pada sentrifugasi tingkat pertama dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 600x g selama 10 menit. Sentrifugasi tingkat kedua dilakukan pada kecepatan 10000x g selama 10 menit. Sentrifugasi tahap ketiga dilakukan pada kecepatan 4000x g selama 10 menit.

Sentrifugasi metode differensiasi diawali dengan sentrifugasi tingkat pertama, dimana supernatan yang dihasilkan diambil untuk kemudian dilakukan sentrifugasi kedua pada kecepatan tinggi untuk memisahkan partikel yang berukuran sedang. Pelet yang dihasilkan pada sentrifugasi kedua dilarutkan dengan buffer Tris-HCl 0,1 M pH 7,4 dengan jumlah yang sama dengan akuades yang digunakan untuk proses homogenisasi.

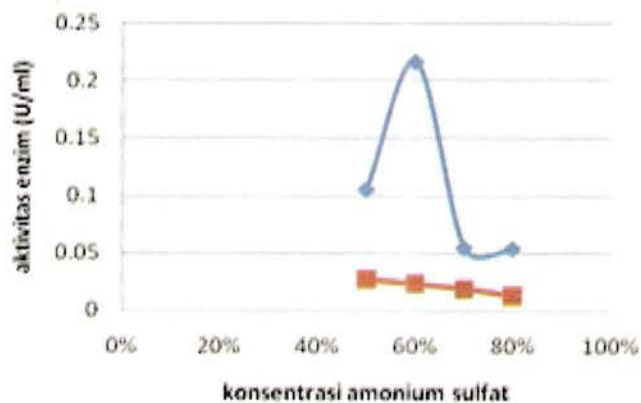
Selanjutnya disentrifugasi kembali untuk memperoleh supernatan yang merupakan ekstrak kasar dari katepsin. Buffer Tris-HCl pH 7,4 yang digunakan sebagai pelarut berfungsi untuk melindungi enzim dari sejumlah besar asam yang dilepaskan dari vakuola pada saat pecahnya sel. Hal ini selaras dengan pendapat Whittaker (1994) yang menyatakan bahwa ekstraksi enzim sebaiknya menggunakan buffer untuk mengontrol pH dekat dengan 7,5 dan konsentrasi ion 0,1-0,5.

Aktivitas ekstrak kasar enzim katepsin ditentukan dengan menggunakan hemoglobin sebagai substratnya dengan konsentrasi 2% pH 2. Hasil pengujian menunjukkan ekstrak kasar enzim katepsin memiliki aktivitas spesifik sebesar 0,45706 U/mg dengan kadar protein sebesar 0,12202 mg/ml. Nilai aktivitas enzim katepsin dipengaruhi oleh jenis ikan, kondisi biologis, kematangan gonad, umur, dan temperatur lingkungan. Aktivitas spesifik ekstrak kasar enzim katepsin dari ikan bandeng (*Chanos chanos* Forskal) mencapai 0,8598 U/mg (Dymar 2011), 9,4 U/mg pada ikan mackerel dan 4,5 U/mg pada milkfish (Jiang *et al.* 1993), 0,16 U/mg pada ikan mas (Liu *et al.* 2008). Beardall dan Johnston (1985) melaporkan bahwa aktivitas enzim katepsin pada ikan saithe (*Pollachius virens* L.) meningkat 70-100% selama kondisi lapar. Pada ikan salmon (*Oncorhynchus keta* L.) menunjukkan aktivitas proteolitik cathepsin L tinggi selama migrasi pemijahan (Yamashita *et al.* 1990). Selanjutnya, Aktivitas katepsin pada otot meningkat cepat selama musim pemijahan ikan sarden (*Sardine pilchardus*) (Gomez-Guillen dan Batisa 1997).

Presipitasi Enzim Kasar

Ekstrak kasar yang diperoleh selanjutnya di presipitasi menggunakan ammonium sulfat dengan tingkat kejenuhan 50%, 60%, 70%, dan 80% dengan tujuan untuk memisahkan dan memurnikan enzim katepsin dari protein-protein lain yang terdapat pada ekstrak kasar enzim katepsin. Pemilihan tingkat kejenuhan ammonium sulfat pada rentang 50%-80% didasarkan pada pendapat Bisswanger (2004) yang menyatakan bahwa tiap presipitasi protein memiliki karakteristik pada konsentrasi reagen yang berbeda. Presipitasi dengan ammonium sulfat pada selang konsentrasi 20-100% dianggap cukup untuk presipitasi protein. Berbagai jenis presipitat yang dapat digunakan pada proses presipitasi diantaranya ammonium sulfat, polimer seperti polietilen glikol (PEG), atau larutan organik seperti aseton atau alkohol (Scopes 1994 diacu dalam Kumar *et al.* 2003). Namun pemilihan ammonium sulfat didasarkan pada pendapat Javois (1999) yang menyatakan bahwa ammonium sulfat dianggap cepat dan murah.

Aktivitas enzim katepsin ikan patin yang telah mengalami pengendapan dengan ammonium sulfat dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1 Aktivitas enzim katepsin setelah pengendapan dengan berbagai konsentrasi ammonium sulfat.

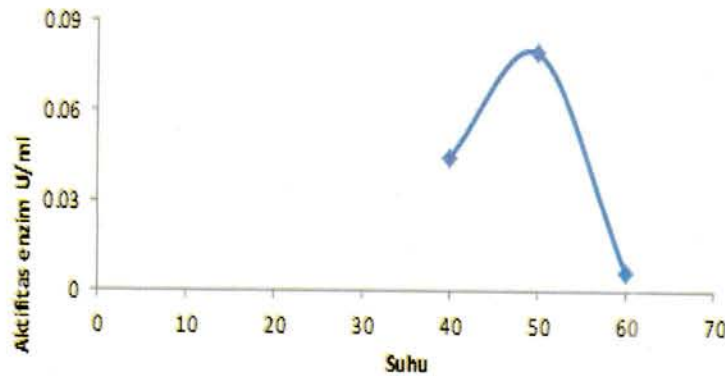
Aktivitas enzim pada pelet lebih besar dibandingkan dengan aktivitas enzim pada supernatan. Aktivitas optimum enzim katepsin pada pelet diperoleh dengan pengendapan ammonium sulfat pada tingkat kejenuhan 60% dengan nilai 0,2162 unit/ml dan aktivitas enzim menurun tajam dengan semakin tingginya tingkat kejenuhan ammonium sulfat. Aktivitas enzim katepsin pada supernatan cenderung mengalami penurunan dengan semakin meningkatnya tingkat kejenuhan ammonium sulfat. Presipitasi menggunakan garam adalah cara pengendapan protein berdasarkan kemampuan ion garam dalam mempengaruhi kelarutan protein. Ion garam dari garam ammonium sulfat, yaitu ion NH_4^+ dan SO_4^{2-} . Pada konsentrasi rendah, ion-ion garam tersebut akan mengelilingi protein dan mencegah bersatunya molekul-molekul ini, sehingga protein larut. Peristiwa ini disebut *salting in*. Pada konsentrasi yang tinggi, terjadi peningkatan muatan listrik disekitar protein yang akan menarik materi air dari koloid protein. Interaksi hidrofobik diantara sesama molekul protein pada suasana yang tinggi akan menurunkan kelarutan protein (Suhartono 1989).

Karakteristik Suhu Ekstrak Kasar Enzim Katepsin

Suhu merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim. Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim katepsin kasar disajikan pada Gambar 2. Aktivitas enzim meningkat dengan adanya peningkatan suhu dari 40 °C menjadi 50 °C, namun peningkatan suhu sampai 60 °C menyebabkan aktivitas enzim menurun. Suhu optimum ekstrak kasar enzim katepsin adalah pada suhu 50 °C dengan nilai aktivitas 0,0749 U/ml.

Pada perubahan suhu, kecepatan reaksi yang dikatalisis oleh enzim mula-mula meningkat karena adanya peningkatan suhu. Energi kinetik akan meningkat pada kompleks enzim dan substrat yang bereaksi. Namun, peningkatan energi kinetik oleh peningkatan suhu mempunyai batas yang optimum. Jika batas tersebut terlewati, maka energi tersebut dapat memutuskan ikatan hidrogen dan hidrofobik yang lemah yang mempertahankan struktur sekunder-tersiernya. Pada suhu ini, denaturasi yang disertai dengan penurunan aktivitas

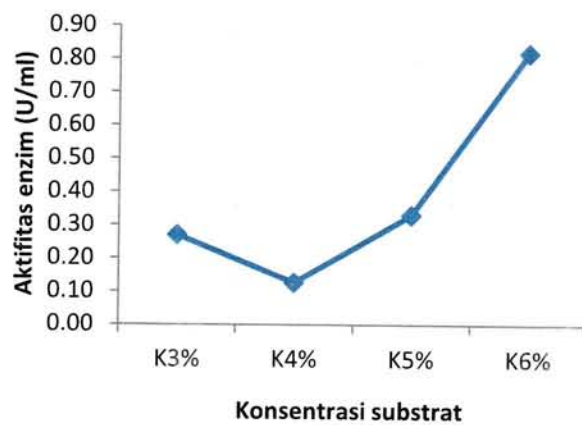
enzim sebagai katalis akan terjadi suhu optimal enzim bergantung pada lamanya pengakuan kadar yang dipakai untuk menentukannya. Semakin lama suatu enzim dipertahankan pada suhu dimana strukturnya sedikit labil, maka semakin besar kemungkinan enzim tersebut mengalami denaturasi.



Gambar 2 Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim katepsin kasar.

Konsentrasi Substrat

Substrat juga merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi laju reaksi enzim. Pada reaksi dengan konsentrasi enzim yang lebih sedikit dibandingkan substrat, penambahan enzim akan meningkatkan laju reaksi. Peningkatan laju reaksi ini terjadi secara linear. Jika konsentrasi substrat dan enzim seimbang, laju reaksi akan relatif konstan. Pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas spesifik enzim dapat dilihat pada Gambar 3. Konsentrasi substrat berpengaruh terhadap aktivitas spesifik enzim yang dihasilkan. Jika konsentrasi substrat dinaikkan, maka aktivitas spesifik enzim akan sampai pada titik tertentu. Konsentrasi substrat sebesar 6% merupakan konsentrasi substrat yang paling tinggi aktivitas spesifik enzim katepsin dengan nilai sebesar 0,8167 (U/ml) tetapi tidak bisa dikatakan bahwa 6% merupakan konsentrasi optimal untuk enzim katepsin karena dengan dinaikkan konsentrasi substratnya diatas 6% kemungkinan akan menemukan jumlah konsentrasi optimal untuk enzim ini.



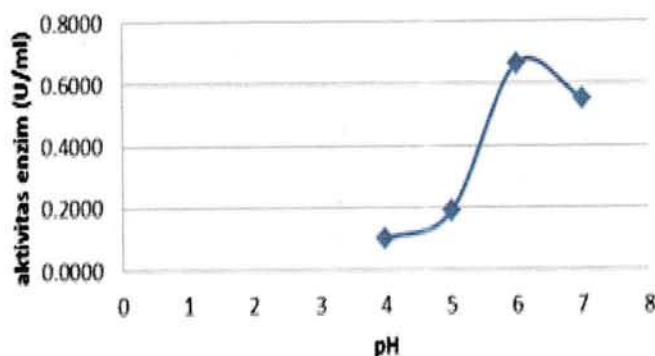
Gambar 3 Pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas spesifik katepsin.

Semakin banyak molekul substrat yang tersedia, semakin sering molekul-molekul tersebut memasuki sisi aktif molekul enzim. Akan tetapi, terdapat keterbatasan dalam memacu kecepatan reaksi dengan cara menambahkan lebih banyak lagi substrat ke suatu konsentrasi enzim yang tetap. Pada suatu titik tertentu, konsentrasi substrat itu akan menjadi cukup tinggi sehingga semua sisi aktif pada semua molekul sudah ditempati oleh substrat. Segera setelah produk meninggalkan sisi aktif, molekul substrat yang lain akan masuk. Pada konsentrasi substrat seperti ini, enzim itu dikatakan mengalami kejenuhan dan laju reaksi ditentukan oleh kecepatan sisi aktif mengubah substrat menjadi produk. Ketika suatu enzim telah jenuh, satu-satunya cara untuk meningkatkan produktivitas adalah menambahkan lebih banyak lagi enzim (Campbell 2002).

Pengaruh pH

Semua reaksi enzim dipengaruhi oleh pH medium tempat reaksi terjadi. Setiap enzim memiliki pH optimum yang khas, yaitu pH yang menyebabkan aktivitas maksimal. Profil aktivitas pH enzim menggambarkan pH pada saat pemberi dan penerima proton yang penting pada sisi katalitik enzim berada pada tingkat ionisasi yang diinginkan. Namun pada pH tertentu (ekstrim) dapat menyebabkan enzim terdenaturasi yang menyebabkan enzim kehilangan aktivitas biologisnya (Lehninger 1993).

Nilai pH sangat berpengaruh terhadap aktivitas spesifik enzim katepsin. Nilai pH yang memberikan aktivitas spesifik terbaik, ditampilkan oleh pH 6 yaitu 0,6660 U/ml. Jika pH kurang atau lebih dari 6, menyebabkan terjadinya penurunan aktivitas spesifik dari enzim katepsin (Gambar 4). Aktivitas spesifik katepsin yang lebih tinggi pada pH 6 juga ditemukan pada ikan nila (Sherekar *et al.* 1988) dan daging ikan mas (Hara *et al.* 1988).



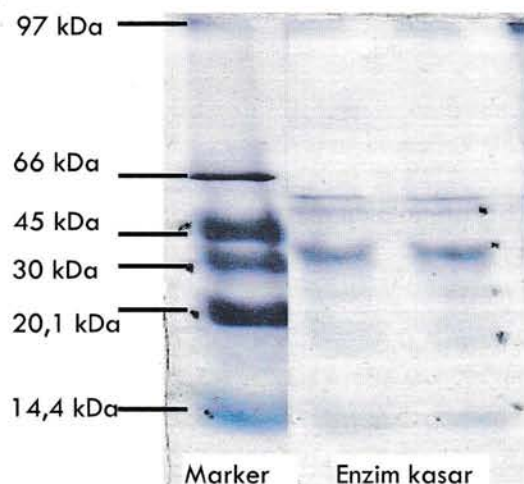
Gambar 4 Pengaruh pH terhadap aktivitas spesifik katepsin.

Bobot Molekul Katepsin

Penentuan bobot molekul dilakukan dengan menggunakan teknik SDS-PAGE (*Sodium dodecyl Sulphates-Poliacrylamida gel Elektroforesis*). Pada metode ini terdapat dua macam gel yaitu gel pemisah (*resolving*) dan gel penahan (*stacking gel*) yang mengandung SDS, APS

(Ammonium perisulfat), akrilamida dan TEMED serta sampel yang akan ditentukan berat molekulnya yaitu ekstrak kasar enzim katepsin.

Hasil analisa berat molekul dengan SDS-PAGE dapat dilihat pada Gambar 5. Marker yang digunakan pada analisa ini berasal dari parmacia. Marker parmacia menggunakan standar LMW (Low Molecular weight). Pada marker parmacia terlihat ada 6 band/pita yang jaraknya ditunjukkan pada Tabel 2, sedangkan pada ekstrak kasar terdapat 5 pita.

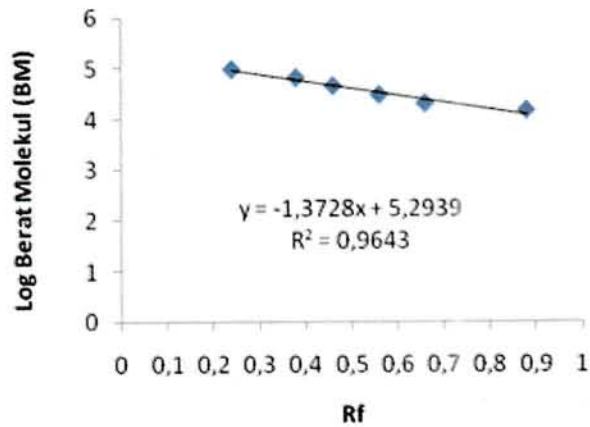


Gambar 5. Hasil analisis SDS-PAGE ekstrak kasar enzim katepsin ikan patin. M = Marker, E= ekstrak kasar

Tabel 1 Jenis standar, berat molekul dan nilai Rf standar parmacia

LMW (14400-97000)	BM	Log BM	Jarak migrasi (cm)	Band (cm)	Rf
Phosphorylase b	97000	4,986772	5	1,2	0,24
Albumin	66000	4,819544	5	1,9	0,38
Ovalbumin	45000	4,653213	5	2,3	0,46
Carbonic anhydrase	30000	4,477121	5	2,8	0,56
Trypsin inhibitor	20100	4,303196	5	3,3	0,66
α -Lactalbumin	14400	4,158362	5	4,4	0,88

Berat molekul ekstrak kasar ditentukan berdasarkan persamaan regresi linear antara nilai Rf dan logaritma berat molekul pada standar (Gambar 6). Persamaan regresi linier adalah $y = -1,372x + 5,293$ dimana $y = \log$ berat molekul marker (kDa), sedangkan $x =$ mobilitas relatif protein (cm). Ekstrak kasar enzim katepsin memiliki berat molekul sebesar 12,97 kDa, 21,51 kDa, 29,50 kDa, 43,10 kDa, dan 55,49 kDa (Tabel 1).

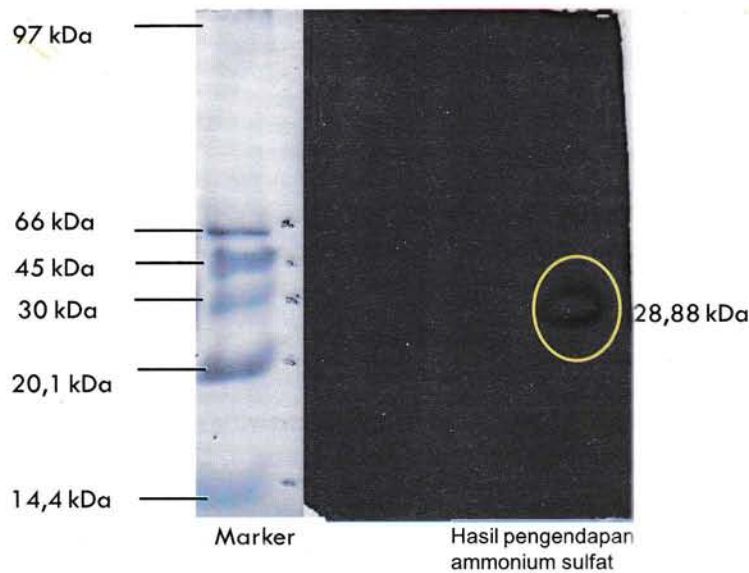


Gambar 6. Kurva standar SDS-PAGE

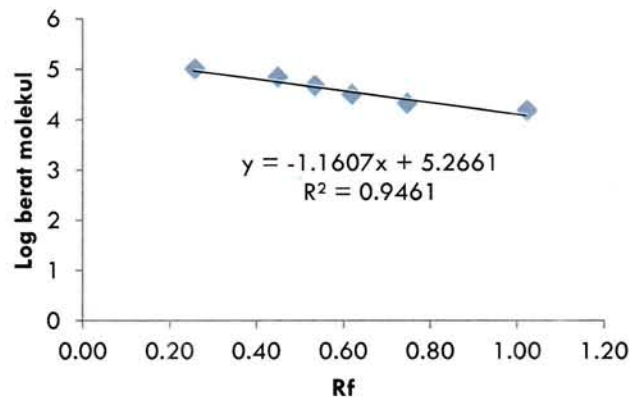
Tabel 2 Perhitungan berat molekul ekstrak kasar enzim katepsin ikan patin

Band	Panjang Migrasi (cm)	Panjang Band (cm)	Rf	a	b	Log BM	BM	BM Kd
1	5	2	0.4	-1.372	5,293	4,7442	55488,12	55,49
2	5	2.4	0.48	-1.372	5,293	4,63444	43096,3	43,10
3	5	3	0.6	-1.372	5,293	4,4698	29498,5	29,50
4	5	3.5	0.7	-1.372	5,293	4,3326	21508	21,51
5	5	4.3	0.86	-1.372	5,293	4,11308	12974,18	12,97

Untuk melihat aktivitas enzim dilakukan uji zimogram dengan elektroforesis. Analisis zimogram hampir sama dengan SDS-PAGE, perbedaannya pada gel ditambah substrat yang sama dengan uji aktivitas dengan spektrofotometri. Sampel pada zimogram tidak mengalami pemanasan seperti pada SDS-PAGE. Selain itu pada zimogram terdapat proses pemulihan protein dengan cara inkubasi. Hasil analisa zimogram dapat dilihat pada gambar 7. Pada ekstrak kasar terdapat band bening yang menunjukkan adanya aktivitas enzim katepsin. Marker yang digunakan berupa pamarca dengan kurva regresi $y = -1,160x + 5,266$ (Gambar 8). Berat molekul dari band bening tersebut dihitung berdasarkan persamaan regresi dari standar dan diperoleh nilai sebesar 28,28 kDa (Tabel 2). Penelitian yang dilakukan Krause *et al.* (2010) menunjukkan bahwa katepsin D yang berasal dari daging ikan *ostrich* memiliki bobot molekul 29,1 kDa. Penelitian lain yang dilakukan oleh Jiang *et al.* (1997) mengenai katepsin D ikan tongkol dan ikan bandeng, menunjukkan bahwa katepsi D pada ikan tongkol terestimasi sebesar 51 kDa dan pada ikan bandeng sebesar 54 kDa.



Gambar 6 Zimogram enzim katepsin ikan patin.



Gambar 7 Kurva regresi linear Zimogram standar pimaricia.

Tabel 3 Perhitungan berat molekul enzim yang mempunyai aktivitas

Band	Panjang Migrasi (cm)	Panjang Band (cm)	Rf	a	b	Log BM	BM	BM (kDA)
Ekstrak kasar	4.7	3.3	0.702128	-1.16	5,266	4,451532	28283,42	28,28

Kesimpulan

Hasil penelitian ekstrak kasar (*crude ekstrak*) enzim katepsin menunjukkan aktivitas spesifik 0,457 U/mg, enzim tersebut dapat diendapkan dengan menggunakan amonium sulfat 60%. Enzim katepsin mempunyai suhu optimum 50 °C dan pH optimum 6, konsentrasi substrat optimum 6% dengan nilai aktivitas 0,8167 U/ml. Berat molekul enzim katepsin kasar hasil SDS-PAGE 12,97-55,49 kDA dan berat molekul enzim yang diduga mempunyai aktivitas

proteolitik pada analisis zymogram adalah 28,88 kDa. Pengendapan dengan menggunakan ammonium sulfat menghasilkan aktivitas spesifik 0,23 kali.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 2007. *Statistik Kelautan dan Perikanan Tahun 2006*. Pusat Data Statistik dan Informasi. Departemen Kelautan dan Perikanan. Badan Pusat Statistik Republik Indonesia
- Aoki T, Yamashita T, Ueno R. 2000. *Distribution of cathepsins in red and white muscles among fish species*. *J. Agric. Food Chem.* 43 : 327-330
- Beardall C, Johnston IA. 1985. Lysosomal enzyme activities in muscle following starvation and refeeding in the saithe *Pollachius Virens* L. *Eur. J. Cell Biol.* 39:112-117.
- Bisswanger H. 2004. *Practical Enzymology*. Germany: Wiley-VCH.
- Bradford MM. 1976. A Rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 72: 234-254.
- Cheret R, Ladrat CD, Anton M de Lamballerie, Bagnis VV. 2007. Calpain and cathepsin activities in *post mortem* fish and meat muscles. *Food Chemistry* 101: 1474-1479
- Dynnar N. 2011. Pemurnian dan karakterisasi enzim katepsin dari ikan bandeng (*Chanos chanos* Forskall). [Skripsi]. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor.
- Dinu D, Dumitru IF, Neichfor MT. 2002. Isolation and characterization of two chatepsin from muscle of *carrasius auratus gibelio*. *Roum. Biotechnol. Lett.* 7(3): 753-758.
- Fentiana N. 2009. Peranan Enzim Protease Jeroan Ikan Bandeng (*Chanos chanos*) dalam proses kemunduran mutu. [Skripsi]. Bogor: Departemen Teknologi Hasil Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor.
- Go'mez-Guille'n MC, Batisa I. 1997. Seasonal changes and preliminary characterizatoin of cathepsin D-like activity in sardine (*Sardina pilchardus*) muscle. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 32: 255-260.
- Haard NF. 2000. *Seafood enzymes: the role of adaptation and another intraspecific factor*. Dalam: Haard NF, Simpson BK, editor. *Seafood Enzymes : Utilization and Influence on Postharvest Seafood Quality*. New York: Marcel Dekker. Inc. hlm 531-547
- Jiang ST, Her YH, Lee JJ, AND Wang JH. 1993. Comparison of the cathepsin D from Mackerel (*Scomber australasicus*) and Milkfish (*Chanos chanos*) muscle. *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry* 57(4): 571-577.
- Javois JC. 1999. *Immunocytochemical Method and Protocols*. New Jersey: Humana Press Inc.
- Krause J, Shonisani C, Tshidino, Tomohisa O, Yasuharu, Vaughan, Bensch S, Muramoto K, Ryno JN. 2010. Purification and partial characterization of ostrich skeletal muscle cathepsin D and its activity during meat maturation. *J. Meat Science.* 87(3): 196-201.
- Kreuzer R. 1965. *The Technology of Fish Utilization*. England : Fishing News (Books) Ltd. Ludgate House 110 Fleet Street London EC4.
- Kumar A, Igor Y, Galaev, Bo M. 2003. *Isolation and Purification Protein*. New York: Marcel Dekker Inc.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the heat of bacteriophage T4. *Nature* 227(10): 680-685.

- Liu H, Yin L, Zhang N, Li S, Ma C. 2008. Isolation of cathepsin B from the muscle of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) and comparison of cathepsins B and L actions on surimi gel softening. *Food Chemistry* 110: 310–318.
- Otto HH, Schirmeister T. 1997. *Sistem Proteases and their inhibitors*. *Chem. Rev* 97(1): 133-172
- Ridwansyah. 2002. *Pengaruh Konsentrasi Hidrogen Peroksida dan lama perendaman Terhadap Mutu Ikan Kembung yang di Pindang*. USU Library : Universitas Sumatra Utara.
- Rao MB, Tanksale ASM, Ghatgate MS, Deshpande VV. 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microb. Mol. Biol. Revw.* 62 : 1092-2171
- Susanto, H dan Amri, K. 2002. *Budi Daya Ikan Patin*. Penebar Swadaya. Jakarta. 90 hal.
- Suhartono MT. 1989. *Enzim dan bioteknologi*. Bogor : Pusat Antar Universitas.
- Whitaker JR. 1994. *Principles of Enzymology for The Food Science*. Second Edition. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Yamashita M, Konagaya S. 1990. Participation of cathepsin L into extensive softening of the muscle of chum salmon caught during spawning migration. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 56: 1271-1277.