

Karakterisasi Hidrolisat Keratin Bulu Ayam Menggunakan Ekstraksi Enzim Kasar Keratinase Dari Bakteri *Bacillus thuringiensis*

Dedech Muhammad Saputra ^{a,1}, Didik Wahyudi ^{b,2*}, Dian Puspita Sari ^{c,3}

^{a,b,c} Program Studi Sarjana Farmasi, Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional, Jl. Raya Solo - Baki, Bangorwo, Kwarasan, Kecamatan Grogol, Kabupaten Sukoharjo, Jawa Tengah, Indonesia 57552

¹ 4191011@student.stkesnas.ac.id; ² didik.wahyudi@stikesnas.ac.id*; ³ dianpuspitasari@stikesnas.ac.id

*korespondensi penulis

INFO ARTIKEL	ABSTRAK
<p>Sejarah artikel : Diterima : 29-08-2023 Revisi : 18-12-2023 Disetujui : 19-12-2023</p> <p>Kata kunci: Ayam <i>Bacillus thuringiensis</i> Keratinase Keratin</p>	<p>Keratin merupakan produk pengerasan jaringan epidermal dari tubuh dan merupakan protein <i>fibrous</i> yang kaya akan sulfur dan merupakan polimer ketiga yang paling melimpah di lingkungan setelah selulosa dan kitin. Bulu ayam dapat digunakan sebagai bahan alternatif keratin karena belum terolah optimal. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hasil hidrolisat keratin enzim kasar keratinase dari bakteri <i>Bacillus thuringiensis</i> dan uji fisika kimia hidrolisat keratin. Metode pembuatan enzim kasar keratinase dilakukan fermentasi bulu ayam menggunakan <i>Bacillus thuringiensis</i>. Hidrolisat keratin bulu ayam diperoleh dari enzim kasar keratinase menggunakan <i>Bacillus thuringiensis</i> yang dilakukan karakterisasi uji fisika dan kimia. Hasil aktivitas enzim keratinase sebesar 3,926 unit/mL yang menghasilkan rendemen 27,2 % Perlakuan ekstraksi dengan enzim keratinase menggunakan <i>Bacillus thuringiensis</i> menunjukkan hasil yang memenuhi syarat yaitu uji ninhidrin dengan warna kebiruan, uji organoleptis, uji kadar air, dan uji pH sedangkan pada uji rendemen, uji kadar abu, dan uji kadar protein tidak memenuhi. Uji FTIR diperoleh hasil pada bilangan serapan 923,94 cm⁻¹, 1232,57 cm⁻¹, 1527,69 cm⁻¹, 1656,92 cm⁻¹, 3296,49 cm⁻¹. Kesimpulan penelitian ini adalah Hasil uji organoleptis, kadar air, pH, ninhidrin, dan uji FTIR pada enzim kasar keratinase yang dihasilkan <i>Bacillus thuringiensis</i> memenuhi dengan standar <i>Safety Assesment of Keratin-Derived Ingredients as Used in Cosmetics</i>, sedangkan uji rendemen, uji kadar protein dan uji kadar abu tidak memenuhi.</p>
<p>Key word: Chicken <i>Bacillus thuringiensis</i> Keratinase Keratin</p>	<p>ABSTRACT</p> <p>Keratin is the product of hardening of the epidermal tissue of the body and is a fibrous protein rich in sulfur and is the third most abundant polymer in the environment after cellulose and chitin. Chicken feathers can be used as an alternative material for keratin because they have not been optimally processed,. This study was aims to determine the results of keratin hydrolyzate from the crude enzyme keratinase from the bacterium <i>Bacillus thuringiensis</i> and chemical physics tests of keratin hydrolyzate. The method of making crude keratinase enzymes was fermented chicken feathers using <i>Bacillus thuringiensis</i>. Hydrolyzed chicken feather keratin was obtained from crude keratinase enzymes using <i>Bacillus thuringiensis</i> which were characterized by physical and chemical tests.The results of the activity of the keratinase enzyme were 3.926 units/ml which resulted in a yield of 43.444%. Extraction treatment with keratinase enzymes using <i>Bacillus thuringiensis</i> showed results that met the requirements, namely the ninhydrin test with a bluish color, organoleptic test, moisture content test, and pH test while the yield test, ash content test, and protein content test did not fulfill. The FTIR test obtained results at an absorption number of 923,94 cm⁻¹, 1232,57 cm⁻¹, 1527,69 cm⁻¹, 1656,92 cm⁻¹, 3296,49 cm⁻¹. The conclusion of this research is that the results of the organoleptic test, water content, pH, ninhydrin, and FTIR test on the crude keratinase enzyme produced by <i>Bacillus thuringiensis</i> meet the standards of Safety Assessment of Keratin-Derived Ingredients as Used in Cosmetics, while the yield test, protein content test and ash content is not sufficient.</p>



This is an open access article under the [CC-BY-SA](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/) license.

Pendahuluan

Keratin adalah biopolimer paling penting dan melimpah kedua yang dihadapi pada hewan. Keratin banyak terkandung dalam rambut, bulu, kuku, wol, tanduk mamalia, reptil dan burung (Rahmawati et al., 2017). Keratin merupakan produk pengerasan jaringan epidermal dari tubuh dan merupakan protein fibrous yang kaya akan sulfur dan merupakan polimer ketiga yang paling melimpah di lingkungan setelah selulosa dan kitin (Sharma dan Gupta, 2017). Keratin telah dipertimbangkan dalam pengembangan biomaterial di bidang biomedis dan farmasi seperti penyembuhan luka, rekayasa jaringan, dan sistem penghantaran obat karena kemampuannya yang unik untuk membantu interaksi sel dan matriks sel. Keratin juga dapat dimodifikasi dan dikembangkan dalam berbagai bentuk seperti gel, film, butiran dan partikel nano / mikro (Afrozi, 2019)

Bulu ayam merupakan salah satu limbah yang kini banyak ditemui, limbah bulu ayam banyak dihasilkan dari industri Rumah Pematangan Ayam (RPA). Banyak bermunculan industri peternakan ayam sebagai dampak positif dari peningkatan permintaan konsumen terhadap daging ayam. Peningkatan industri peternakan ayam turut mendorong usaha pematangan ayam yang berdampak pada peningkatan limbah industri berupa bulu ayam. Tahun 2021 potensi bulu ayam di Indonesia meningkat sangat besar, mengingat produksi daging ayam broiler tercatat sejumlah 3,45 juta ton, data tersebut dapat diestimasi jika jumlah bulu sebesar 5 persen dari tubuh ayam (Badan Pusat Statistik, 2022). Potensi limbah bulu ayam jika tidak dimanfaatkan maksimal akan menimbulkan dampak buruk berupa pencemaran lingkungan.

Limbah bulu ayam dapat diolah dengan cara mekanik, kimia, dan biologi/enzimatis dapat menghasilkan berbagai produk yang dapat dimanfaatkan lebih lanjut terutama pada pertumbuhan rambut, dikarenakan kandungan Protein pada bulu ayam sebagian besar kandungan utamanya berupa protein keratin \pm 90% (Jayalaksmi et al., 2011). Keratin melayani fungsi struktural dan pelindung yang penting, terutama di epitel. Pertumbuhan sel epitel, peningkatan massa dan ukuran sel, diatur melalui sintesis protein. Keratin telah dipertimbangkan dalam pengembangan biomaterial di bidang biomedis dan farmasi seperti penyembuhan luka, rekayasa jaringan, dan sistem penghantaran obat karena kemampuannya yang unik untuk membantu interaksi sel-sel dan sel matriks, infiltrasi seluler, dan proliferasi dengan sedikit atau tidak ada imunogenisitas (Akanda et al., 2017). Kandungan nutrisi bulu ayam adalah 81% protein, 1,2% lemak, 86% bahan kering, 1,3% abu,

mineral kalsium 0,19%, fosfor 0,04%, kalium 0,15%, dan sodium 0,15% (Rahayu et al., 2014).

Enzim keratinase termasuk dalam kelas hidrolase yang mampu menghidrolisis keratin tidak larut lebih efisien dibandingkan protease lainnya. Beberapa isolat *Bacillus* menghasilkan keratinase yang bekerja pada bulu misalnya, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus pseudofirmus*, dan *Bacillus thuringiensis*. *Bacillus thuringiensis* adalah salah satu spesies bakteri yang diketahui memiliki kemampuan membunuh serangga yang tergolong ke dalam *ordo Lepidoptera*, *Diptera*, *Coleoptera* dan *Hymenoptera*, serta *Nematoda*. Strain *Bacillus thuringiensis* diketahui memproduksi dan mengeluarkan sejumlah besar enzim ekstraseluler dan merupakan kelompok utama produsen enzim industri karena sifat organisme yang kuat serta enzimnya (Sivakumar et al., 2012). *Bacillus thuringiensis* isolat terbukti menghasilkan sejumlah besar keratinase dalam kondisi optimal dalam fermentasi solid state menggunakan tepung tanduk sebagai substrat (Bahri et al., 2021).

Optimalisasi fungsi dan kegunaan dari bulu ayam broiler dilakukan dengan mengekstraksi keratin secara enzimatik menggunakan enzim kasar keratinase hasil dari *Bacillus thuringiensis*. Keratin diproduksi dari enzim kasar keratinase menggunakan mikroorganisme penghasil protease keratinase. Enzim keratinase menyerang substrat protein keratin yang tidak larut dan dengan demikian melepaskan amino bebas kelompok yang mengandung molekul (Shah, Tyagi, Bharagava, & Belhaj, 2019). Sehingga, karakterisasi perlu dilakukan oleh peneliti untuk mengetahui pengaruh dari perlakuan pembuatan hidrolisat keratin sesuai dengan standar. Beberapa peneliti (D & G, 2019; desmelati, 2021; Rahmawati et al., 2017) telah melakukan analisis karakterisasi hidrolisat keratin pada beberapa substrat dengan hasil yang bervariasi. Shah, Tyagi, Bharagava, Belhaj, et al., 2019 menyebutkan bahwa peluang hasil hidrolisat keratin dari bahan organik memiliki peluang yang sangat besar untuk dieksplorasi lebih lanjut, terutama yang bersumber dari hewan. Bulu ayam menjadi alternatif pilihan yang sangat menjanjikan, karena tersedia melimpah di Indonesia, dan belum dikaji lebih dalam dan komprehensif untuk dimanfaatkan menjadi produk yang lebih memiliki nilai untuk kehidupan masyarakat luas. Penelitian bertujuan untuk mengetahui hasil hidrolisat keratin dari enzim kasar keratinase dari bakteri *Bacillus thuringiensis* dan uji fisika kimia hidrolisat keratin.

Metode

Penelitian ini menggunakan keratin yang diekstrak dari enzim keratinase hasil isolat bakteri

Bacillus thuringiensis dan kemudian diuji karakterisasi keratin. Ekstraksi terdapat dua tahap, yaitu menggunakan NaOH dan enzim keratinase, enzim keratinase yang dihasilkan dari bakteri tersebut selanjutnya dibentuk menjadi keratin. Keratin yang didapat selanjutnya dibandingkan sifat fisika dan kimianya, sifat fisika dan kimia yang dimaksud adalah uji organoleptis, uji proksimat yang meliputi kadar air, kadar abu, dan kadar protein, serta pengujian gugus fungsi dengan *spektrofotometer infra-red*

I. Alat dan Bahan

Oven, blender, ayakan, timbangan, erlenmeyer, kompor, autoklaf, petri dish, jarum ose, beaker glass, tabung reaksi, rotary shaker, termometer, Buret, cawan porselin, desikator, destilator, Erlenmeyer, freezer, gelas beker, gelas ukur 10 ml, gelas ukur 100 ml, kaca arloji, kompor, kurs porselin, labu alas bulat, labu ukur 50 ml, labu ukur 250 ml, penjepit tabung, pH meter, pipet volume, pipet tetes, push ball, spektrofotometer infra-merah, tabung reaksi, tanur, dan timbangan analitik.

Bulu ayam, NaOH(Merck), medium NA(Oxoid), aquadest, *Bacillus thuringiensis*, ekstrak ragi, pepton, K_2HPO_4 (Merck), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (Merck), $CaCl_2$ (Merck), Na_2CO_3 (Emba), HCl (Merck), nihidrin 1%, asam sulfat pekat (Oxoid), indikator Phenolphthalein (Oxoid).

2. Jalannya Penelitian

Bagian

1. Pembuatan Serbuk Bulu Ayam

Bulu ayam dicuci dengan menggunakan sabun dan air hingga bersih lalu direbus selama 2-3 jam. Bulu ayam yang telah dibersihkan kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 60 °C sampai kering. Selanjutnya bulu diblender dan disaring dengan saringan tepung sehingga menjadi tepung bulu ayam (susanti et al., 2021).

2. Pembuatan Ekstrak Enzim Kasar Keratinase

a. Peremajaan Bakteri

Peremajaan bakteri menggunakan metode streak dengan cara menggoreskan mikroorganisme diatas permukaan medium NA padat menggunakan jarum ose. Kemudian diinkubasi selama 5 hari pada suhu ruang sehingga permukaan agar dipenuhi oleh bakteri, selanjutnya dipurifikasi menggunakan media selektif NA sebanyak 3 kali atau hingga didapatkan satu jenis koloni murni yang konsisten dan tidak bercampur dengan koloni bakteri lain (susanti et al., 2021).

b. Pembuatan Stater Isolat Bakteri

Diambil sebanyak 10 ose isolat *Bacillus thuringiensis* pada medium padat Nutrien Agar, kemudian dimasukkan dalam medium NB dan 100 mL medium tepung bulu yang bersisi tepung bulu ayam 100 mg, yeast extract 1 mg, pepton 1 mg, K_2HPO_4 1 mg, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 mg, $CaCl_2$ 1 mg, 1 mg Na_2CO_3 , 100 mL air desilata dengan kondisi pH 7. Selanjutnya diinkubasi dengan rotary shaker dengan kecepatan 120 rpm selama 24 jam pada suhu ruangan (Marzuki, 2015).

c. Persiapan Ekstraksi Enzim Kasar

Pembuatan ekstrak enzim kasar yang diambil dari hasil biakan dihomogenasikan lalu dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi. Biakan tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang didapatkan merupakan ekstrak enzim kasar, dilakukan pemekatan yaitu dengan cara freeze drying (Marzuki, 2015).

d. Aktivitas Enzim Keratinase

Tepung bulu sebanyak 1 Gram dilarutkan dalam 160 ml larutan penyangga fosfat (pH 7,0-7,2). Kemudian enzim keratinase sebanyak 0,16 ml ditambahkan ke dalam larutan dan reaksi diinkubasi pada suhu 50 °C dengan inkubator selama 120 menit . Larutan didinginkan menggunakan es hingga dingin lalu disaring menggunakan kertas Whatman nomor 1. Kontrol dalam uji aktivitas enzim keratinase adalah tepung bulu sebanyak 1 Gram yang dilarutkan dalam 160 ml larutan penyangga fosfat (pH 7,0-7,2) tanpa penambahan enzim keratinase (Marzuki, 2015).

3. Pembuatan Hidrolisat Keratin

40 Gram bulu ayam yang telah dibersihkan kemudian direndam larutan NaOH 0,5 M (rasio 1:30), ditambahkan HCl 2 M hingga pH 7 dan diamkan selama 24 jam pada suhu ruang, selanjutnya disaring menggunakan kertas saring. Kemudian bulu dihidrolisis menggunakan air (rasio 1:30) dan ditambahkan enzim kasar keratinase 3,2 Gram dengan suhu $60 \pm 2^\circ C$ selama 18 jam dalam inkubator, kemudian supernatan diendapkan menggunakan 2 M HCl sampai pH 4 dan dilakukan penyaringan (Rahmawati et al., 2017). Endapan dioven selama 24 jam dengan suhu 35-37°C (Desmelati, 2021).

4. Uji Kualitatif

Uji kualitatif dilakukan dgn cara 3 gram hidrolisat keratin ditambahkan dengan 10 tetes larutan ninhidrin dalam tabung reaksi,

selanjutnya dipanaskan selama 1-2 menit. Hasil positif mengandung keratin ditandai dengan perubahan warna larutan dalam tabung reaksi menjadi biru sesuai asam amino yang terkandung dalam keratin yaitu sistein (Ata et al., 2016).

5. Karakterasi Keratin

a. Sifat Fisika

1) Uji Organoleptis

Uji organoleptis dilakukan dengan mengamati dan membandingkan bau dan bentuk menggunakan panca indra, uji ini dilakukan pada sample keratin.

2) Uji Derajat pH

Sampel hidrolisat keratin ditambah air suling dengan rasio 1:100 (b/v) kemudian diukur derajat keasamannya menggunakan pH meter.

b. Sifat Kimia

1) Uji Kadar Protein Kasar

a. Dekstruksi

Sampel hidrolisat keratin sebanyak 0,3 gram dimasukkan dalam labu alas bulat 100 ml kemudian ditambahkan 10 ml asam sulfat pekat. Campuran larutan dipanaskan menggunakan api kecil yang dengan perlahan api dibesarkan. hingga didapatkan larutan berwarna jernih kehijauan (Rosaini *et al.*, 2015)

b. Destilasi

Hasil destruksi yang telah dingin ditambahkan 100 ml air suling dimasukkan dalam labu destilasi dan ditambahkan 10 ml larutan NaOH 30% hingga terbentuk lapisan dibawah larutan asam agar lebih mudah terdestilasi. Selanjutnya, pada erlenmeyer penampung hasil destilasi ditambahkan 5 tetes indikator metil merah dan 10 ml larutan HCl 2N untuk mengidentifikasi hasil destilasi. Hasil destilasi dicek menggunakan kertas lakmus, apabila tetap berwarna merah (tidak bersifat basa) maka dapat dihentikan (Rosaini *et al.*, 2015).

c. Standarisasi Larutan NaOH

I. Pembuatan Larutan Asam Oksalat 0,1N

1,575 Gram serbuk asam oksalat dilarutkan dalam 10 ml air suling, kemudian larutan dimasukkan dalam labu ukur 250 ml dan ditambahkan air suling hingga tanda batas (Husna Hudaya, 2016).

2. Pembuatan Larutan NaOH 0,1 N

1 Gram NaOH dilarutkan dalam 10 ml air suling, kemudian larutan dimasukkan dalam labu ukur 250 ml dan ditambahkan air suling hingga tanda batas (Husna Hudaya, 2016)

3. Standarisasi Larutan NaOH

Larutan NaOH dimasukkan ke dalam buret yang sebelumnya telah dibilas dengan larutan NaOH. Dipipet 10 ml larutan asam oksalat dimasukkan dalam erlenmeyer dan ditambah dengan 3 tetes indikator pp, kemudiandititrasi menggunakan larutan NaOH. Titik akhir titrasi ditandai dengan perubahan warna menjadi warna merah muda (Husna Hudaya, 2016).

4. Titrasi Dengan NaOH

Larutaaan blanko dititrasi menggunakan NaOH sebagai pembanding. Hasil destilasi dititrasi menggunakan larutan NaOH 0,5 M yang telah distandarisasi. Tahap titrasi dapat dihentikan bila titik akhir titrasi telah tercapai, ditandai dengan warna merah muda menjadi kuning (Rosaini *et al.*, 2015).

2) Uji Kadar Air

Cawan porselin bersih dipanaskan pada oven dengan suhu 105° C selama 2 jam, kemudian didinginkan lalu ditimbang. Sampel keratin ditimbang sebanyak 0,5 g dimasukan dalam cawan dan dioven selama 8 jam pada suhu 105o C, kemudian didinginkan dalam desikator selama 30 menit dan ditimbang kembali. Kadar air dihitung denan rumus (Nurhidayah *et al.*, 2019)

3) Uji Kadar Abu

Tara krus porselin bersih di tanur pada suhu 800° C selama 2 jam, kemudian didinginkan pada desikator selama 30 menit dan ditimbang, sampel keratin sebanyak 0,5 g dimasukan dalam krus porselin yang telah ditara dan dimasukan tanur pengabuan listrik selama 3 jam pada suhu 800o C, lalu didinginkan dalam desikator selama 30 menit dan ditimbang. Kadar abu dihitung dengan rumus (Nurhidayah *et al.*, 2019) :

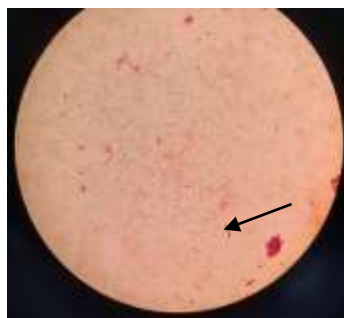
4) Analisis Spektrofotometer Infra-Merah

1 mg dari sampel keratin kering dicampur dengan 1 mg KBr kemudian ditumbuk dengan mortir. Tahap

selanjutnya ditata dalam pellet dan ditekan sampai membentuk lapisan transparan. Pelet diletakkan pada tempat sampel dan di analisis menggunakan spektrometer inframerah pada daerah spektra 1000-4000 cm-1 (Ristaningrum, 2020).

Hasil dan Pembahasan

Kultur *Bacillus thuringiensis* yang telah ditumbuhkan pada substrat dilakukan karakterisasi secara makroskopis (koloni) dan mikroskopis (susunan sel pada pewarnaan Gram), untuk mengamati warna, bentuk dan ukuran koloni ketiak ditumbuhkan pada media, dan melihat susunan serta bentuk selnya. Hasil pengamatan yang dilakukan setelah proses inkubasi selama 5 hari adalah terdapat koloni yang berbentuk circular, warna putih kekuningan dan kenampakan permukaan koloni sedikit kasar dan mengkilap. Bakteri *Bacillus thuringiensis* diidentifikasi dengan cara pewarnaan (Gambar 1).



Gambar 1. Hasil uji mikroskop *Bacillus thuringiensis*
Ket: Sel berbentuk batang dan berwarna ungu

Hasil pengamatan mikroskop bakteri berbentuk batang berderet terdapat sepora dan berwarna ungu. Hal ini sesuai dengan literatur yang mengatakan bahwa *Bacillus thuringiensis* merupakan bakteri Gram positif dan berbentuk basil dan dapat pembentukan spora. Peptidoglikan, asam teikuronat serta asam teikoat yang terkandung dalam dinding sel bakteri Gram positif ini yang menentukan warna yang muncul pada bakteri golongan ini (Bahri *et al.*, 2021).

Fermentasi bulu menggunakan *Bacillus thuringiensis* dapat memproduksi asam amino esensial seperti treonin, valin, metionin, isoleucin, leusin, lisin, histidin, dan tirosin pada media tepung bulu ayam. Hasil fermentasi oleh isolat *Bacillus thuringiensis* pada media menunjukkan adanya perubahan warna kekuningan setelah 24 jam inkubasi, serta menimbulkan bau khas yang menyengat. Perubahan tekstur terjadi akibat adanya hidrolisis protein sehingga membentuk tekstur halus dan remah. Sedangkan, perubahan warna terjadi akibat adanya reaksi pencoklatan (browning) yang disebabkan aktifitas bakteri penghasil enzim oksidasi, (Shah,

Tyagi, Bharagava, Belhaj, *et al.*, 2019) menyatakan bahwa tekstur bahan banyak ditentukan oleh kadar air, lemak, jumlah karbohidrat (selulosa, pati, pektin), dan yang utama adalah proteinnya. Perubahan tekstur dapat disebabkan oleh hilangnya kandungan air atau lemak, pecahnya emulsi, hidrolisis karbohidrat dan koagulasi atau hidrolisis protein, sedangkan Rahmawati *et al.*, 2017 menyebutkan bahwa aktivitas bakteri golongan proteobacteria mampu mengoksidase substrat dengan efek samping terjadi perubahan warna pada bahan tersebut.



Gambar 2. Hasil fermentasi

Aktivitas keratinase diukur dengan menggunakan spektrofotometer secara kuantitatif pada panjang gelombang 280 nm karena pada gelombang tersebut dapat mendeteksi asam amino sistin pada keratin (Marzuki, 2015). Pada penelitian ini menghasilkan aktivitas enzim keratinase menggunakan bakteri *Bacillus thuringiensis* dengan pH 7.0 yaitu sebesar 3,8 unit/ml.

Hidrolisat keratin diawali dengan perlakuan awal yaitu dengan merendam serbuk bulu ayam menggunakan NaOH 0,1 M kemudian dilanjutkan dengan hidrolisis menggunakan enzim keratinase dan dilakukan pengendapan menggunakan HCl sampai pH 4. Hasil hidrolisis bulu ayam dengan larutan NaOH dan enzim keratinase ini berupa endapan dan larutan yang berubah warna menjadi coklat tua, dengan berat rendemen 27,2%.

Karakterisasi pada hidrolisat keratin dari bulu ayam dengan uji kualitatif, fisika, dan kimia.

A. Uji kualitatif

Uji kualitatif dengan ninhidrin menunjukkan bahwa hasil reaksi berwarna biru pekat, hal tersebut menandakan keberadaan asam amino pada bulu ayam. Asam amino yang terdapat pada bulu ayam kemungkinan berasal dari protein keratin, asam amino yang menyusun keratin salah satunya adalah sistin (Suwandi & Yogaswari, 2010).



Gambar 3. Hasil Uji Ninhidrin

Uji ninhidrin bertujuan untuk menentukan apakah ada tidaknya gugus asam amino bebas dalam sampel. Reaksi yang terjadi antara sampel dan pereaksi ninhidrin menyebabkan terbentuknya senyawa kompleks diketohidridindolen- diketohidridindamin. Semua asam amino alfa bereaksi dengan ninhidrin membentuk aldehida dengan satu atom C lebih rendah dan melepaskan NH₃ dan CO₂. Selain itu terbentuk kompleks berwarna biru yang disebabkan oleh 2 molekul ninhidrin yang bereaksi dengan NH₃ (Ata *et al.*, 2016).

B. Sifa Fisika

1. Rendemen Hidrolisat Keratin

Hasil hidrolisat keratin pada bulu ayam yang telah diproses, didapatkan hasil hidrolisat keratin sebanyak 27,2% (Tabel I).

Tabel I. Hasil Hidrolisat Keratin

Serbuk bulu ayam	Berat hidrolisat keratin	Persen hidrolisat keratin
37,5 g	10,2 g	27,2%

Penyebab tidak maksimalnya perolehan jumlah rendemen keratin adalah perlakuan sebelum proses pengeringan, perlakuan yang dimaksud adalah pemisahan keratin basah dari larutannya HCl. Pemisahan yang dilakukan (desmelati, 2021) dilakukan dengan menggunakan alat *sentrifugator*, sehingga dapat terpisah sempurna dari larutan penyarinya, sedangkan penelitian ini menggunakan saringan kain sebagai alat pemisah hidrolisat keratin basah, penggunaan alat saringan tersebut yang berpotensi menurunkan jumlah rendemen keratin karena keratin dapat lolos dari pori-pori saringan dan ikut terbawa kembali oleh larutan penyari.

2. Uji Organoleptis

Tabel 2. Hasil organoleptis hidrolisat keratin

Parameter	Keratin
Bentuk	Serbuk
Warna	Coklat keputihan
Bau	Bau khas sedikit amis

Hidrolisat keratin berbentuk serbuk, berwarna coklat dan berbau menyengat, dengan demikian rendemen keratin yang dihasilkan merupakan rendemen yang memenuhi syarat mutu bentuk, warna, dan bau.



Gambar 4. Hasil Hidrolisat Keratin

Penelitian sebelumnya (Perikanan & Dharmawangsa, 2020) dengan metode yang sama memberikan hasil warna cukup coklat bau sangat menyengat berbentuk serbuk terurai. Hal ini memberikan hasil yang hampir sama dengan hasil penelitian sebelumnya.

3. Uji Derajat Keasaman

Uji derajat keasaman dilakukan untuk mengetahui apakah derajat keasaman dari rendemen yang dihasilkan memenuhi syarat derajat keasaman keratin yang baik atau tidak. Syarat derajat keasaman keratin yang baik adalah 6,5-8, dengan demikian rendemen keratin memenuhi penilaian keamanan derajat keasaman keratin dengan nilai derajat keasaman yaitu 7. Hasil uji derajat keasaman sejalan dengan penelitian desmelati. (2021) dengan derajat keasama 7,2 dan Rahmawati *et al.*, 2017 dengan derajat keasaman 7,4. Kedua penelitian tersebut menggunakan metode yang sama dengan penelitian ini, menghasilkan keasaman keratin yang hampir sama juga.

C. Sifa Kimia

1. Uji Kadar Air

Kadar air di dalam keratin akan berpengaruh terhadap daya simpan, karena kadar air erat kaitannya dengan aktivitas metabolisme yang terjadi selama keratin disimpan seperti aktivitas enzim, aktivitas mikroba dan aktivitas kimiawi yaitu terjadi ketengikan dan reaksi-reaksi non-enzimatik sehingga menimbulkan perubahan sifat-sifat organoleptik dan nilai mutunya. Semakin tinggi kadar air di dalam keratin maka singkat umur keratin, namun sebaliknya apabila kadar air rendah maka umur simpan keratin semakin lama (Nurhidayah, 2019). Hasil kadar air yang diperoleh pada penelitian ini yaitu sebesar 0,4928%. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan sebelumnya oleh

(Studi et al., 2016) yang menunjukkan hasil 11,69%. Hasil yang diperoleh menunjukkan hasil yang optimal yaitu kurang dari 12%.

2. Uji kadar abu

Kadar abu ditentukan dengan mengoksidasikan semua zat organik pada suhu tinggi yaitu suhu 800° C selama 3 jam. Hasil uji kadar abu dari keratin menunjukkan kadar abu yang melebihi dari penilaian keamanan keratin yang ditentukan, yaitu maksimal 4%. Hasil yang diperoleh pada penelitian ini sebesar 6,14%. Tingginya kadar abu disebabkan karena bulu ayam yang digunakan sebagai bahan utama tersusun atas senyawa mineral berupa kalsium, kalsium yang merupakan senyawa anorganik tidak akan hangus saat berada disuhu tinggi dalam tanur, yaitu 800° C, senyawa an-organik yang tidak hangus itulah yang disebut kadar abu. Keterlarutan senyawa anorganik bersama keratin dapat dicegah dengan menambahkan perlakuan pencucian serbuk bulu ayam dalam *Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid* (EDTA) sebelum proses perlakuan awal. Menurut (Pamungkas et al., 2018), EDTA memiliki aktivitas demineralisasi yang mampu menurunkan kadar abu dalam protein.

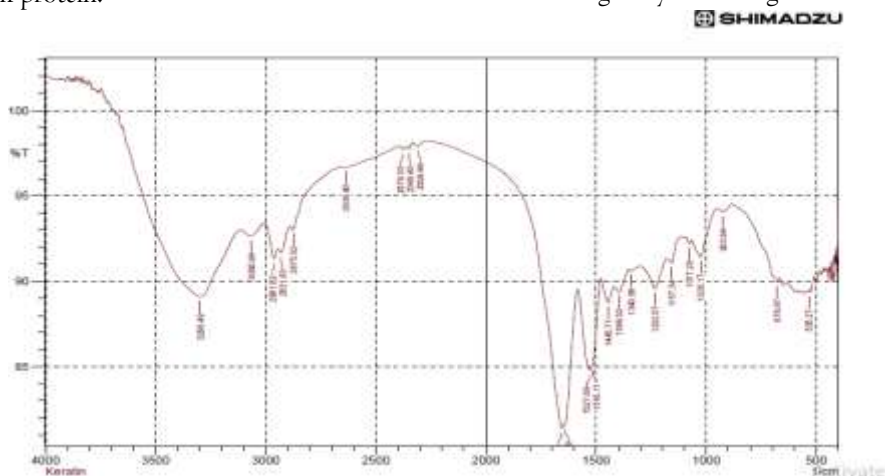
kadar air pada tepung bulu ayam sebesar

3. Uji kadar protein

Metode *Kjedahl* menetapkan kadar protein kasar berdasarkan keberadaan nitrogen, metode *Kjedahl* dipilih karena dapat mengkoagulasi protein yang akibat pemanasan maupun pengolahan lain (Fardiyansyah, 2017). Kadar protein hidrolisat keratin pada konsentrasi enzim 8% yaitu sebesar 43,443%. Kadar protein dihitung berdasarkan kadar nitrogen total (metode *Kjeldahl*). Kadar protein hasil penelitian ini lebih tinggi jika dibandingkan kadar protein hidrolisat keratin hasil penelitian yang menghidrolisis bulu domba menggunakan Ca(OH)₂ selama 24 jam dan enzim protease 5% selama 24 jam dihasilkan protein sebesar 11.1%. P. Mokrejs et al., (2011)

4. Analisis Gugus Fungsi Dengan Spektrofotometer Infra-Merah

Analisis gugus fungsi terhadap keratin perlu dilakukan untuk mendapatkan gambaran gugus fungsi khas yang harusnya dimiliki oleh senyawa tersebut. Puncak serapan sekitar 900-1000 cm⁻¹ mewakili ikatan di-sulfida dalam keratin dan intensitasnya meningkat seiring dengan meningkatnya kandungan keratin dalam film.



	Peak	Intensity	Corr. Intensity	Base (H)	Base (L)	Area	Corr. Area
1	535.27	89.36	0.027	536.23	529.48	0.328	0.001
2	678.97	89.936	0.491	883.44	667.4	7.219	0.077
3	923.94	94.063	0.304	948.05	884.4	1.642	0.049
4	1026.17	91.41	1.63	1065.72	949.02	3.888	0.381
5	1077.29	92.189	0.294	1094.65	1066.88	0.965	0.018
6	1157.34	91.07	0.671	1178.56	1113.94	2.405	0.069
7	1232.57	89.553	1.571	1298.15	1179.52	5.199	0.399
8	1340.58	90.584	0.146	1352.16	1298.15	2.283	0.016
9	1396.52	89.377	0.614	1415.81	1352.16	2.954	0.1
10	1445.71	88.751	1.163	1478.5	1416.78	3.024	0.177
11	1516.11	84.982	0.133	1517.08	1479.47	2.169	0.024
12	1527.69	84.782	0.817	1582.66	1519.01	4.018	0.23
13	1641.49	81.585	0.168	1642.46	1583.63	3.956	0.057
14	1656.92	81.387	0.44	2251.99	1648.24	15.002	0.026
15	2306.96	87.893	0.169	2322.39	2280.92	0.362	0.014
16	2349.4	97.748	0.25	2359.04	2334.93	0.224	0.014
17	2378.33	97.701	0.198	2391.83	2366.76	0.242	0.011
18	2636.8	96.664	0.025	2641.63	2392.8	3.032	0.075
19	2875.02	93.021	0.383	2887.56	2660.92	4.605	0.025
20	2931.93	91.67	0.518	2944.46	2888.53	1.94	0.065
21	2961.82	91.327	0.974	3006.19	2945.43	2.13	0.116
22	3065.98	92.651	0.028	3067.91	3007.15	1.912	0.011
23	3296.49	89.095	5.519	3614.76	3112.28	18.621	8.03

Gambar 5. Hasil Spektrofotometer Infra-Red

Tabel 3. Hasil analisis Wilayah Serapan *Infra-Red* Hirolsat Keratin

Wilayah serapan(cm^{-1})	Bilangan serapan (cm^{-1})	Kelompok fungsional
900-1000	923,94	Ikatan disulfida (S-S) pada keratin
1200-1240	1232,57	Amida III = vibrasi stretching C-N dan bending N-H
1335-1550	1527,69	Amida II = vibrasi bending N-H dan stretching C-H
1600-1700	1656,92	Amida I = vibrasi stretching C=O
3000-3500	3296,49	Vibrasi stretching OH atau NH

Spektrum FTIR zona uji berkisar antara 1.400 hingga 4.000 cm^{-1} dikenal sebagai zona "gugus fungsi". Spektrum puncak zona "gugus fungsi" untuk hidrolisat keratin berada pada panjang gelombang 3000-3500, 1600-1700, 1335-1550, 1200-1240, dan 900-1000 cm^{-1} . Penelitian oleh (Bayramoglu, 2019) terhidrolisis menghasilkan keratin menghasilkan puncak pada panjang gelombang 900-1000 untuk ikatan disulfida pada keratin, 1600-1700 cm^{-1} untuk amida I, 1335-1550 cm^{-1} untuk amida II, dan untuk amida III dalam 1200-1240 cm^{-1} , vibrasi stretching OH atau NH 3000-3500 cm^{-1} . Uji FTIR keratin terhidrolisis dari penelitian ini menunjukkan bahwa zona amida yang diperoleh pada puncak ikatan disulfida pada 923,94 cm^{-1} , amida I berada pada 1656,92 cm^{-1} , puncak amida II pada 1527,69 cm^{-1} , amida III berada di 1232,57 cm^{-1} , dan vibrasi stretching OH atau NH pada 3296,49 cm^{-1} . Menurut (Bayramoglu, 2019), amida I dengan puncak 1650 cm^{-1} dan amida II dengan puncak pada 1547 cm^{-1} memiliki struktur berbentuk heliks. Pada penelitian ini memiliki hasil yang sama yaitu berbentuk heliks dengan amida I pada puncak 1656,92 cm^{-1} dan amida II pada puncak 1527,69 cm^{-1} . Berdasarkan hasil identifikasi dan karakteristik uji FTIR sejalan dengan penelitian sebelumnya, D & G, 2019 dan Shah, Tyagi, Bharagava, Belhaj, *et al.*, 2019), kedua penelitian menunjukkan rentang hasil analisis yang hampir sama, meskipun menggunakan bahan yang berbeda, hal ini menjadi gambaran bahwa spektrum zona "gugus fungsi" pada hemolisat keratin pada panjang gelombang yang sama menunjukkan rentang nilai yang hampir sama juga.

Simpulan dan Saran

Hasil karakterisasi fisika kimia hidrolisat keratin yang diperoleh dari enzim kasar keratinase yang dihasilkan *Bacillus thuringiensis* sesuai dengan standar *Safety Assesment of Keratin-Derived Ingredients as Used in Cosmetics* yaitu uji organoleptis, uji kadar air, uji derajat keasaman, uji ninhidrin, dan uji FTIR. Sedangkan, untuk uji rendemen, uji kadar protein dan uji kadar abu tidak sesuai dengan standar *Safety Assesment of Keratin-Derived Ingredients as Used in Cosmetics*.

Pada penelitian ini diperlukan penambahan EDTA pada perlakuan awal untuk menghilangkan kandungan kalsium pada bulu ayam yang dapat menurunkan kadar abu Perlu dan dilakukan replikasi pada masing-masing pengujian supaya mendapatkan hasil yang lebih akurat.

Daftar Pustaka

- Afrozi, P. L. (2019). *View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk*. 3(2), 74–78.
- Akanda, R., Kim, H., Mira, T., Kim, I., Ahn, D., Byung-, H. T., & Park, Y. (2017). *Aktivitas mempromosikan pertumbuhan rambut dari ekstrak keratin biokomposit yang dibuang*. 0(0), 1–12.
<https://doi.org/10.1177/0885328217717076>
- Ata, S. T. W., Yulianty, R., Sami, F. J., Ramli, N., Selatan, S., & Selatan, S. (2016). *Isolasi Kolagen Dari Kulit Dan Tulang Ikan Cakalang (Katsuwonus)*. 1(1), 27–30.
- Bahri, S., Zulkifli, L., Ayu, D., Rasmi, C., & Sedijani, P. (2021). *Jurnal Biologi Tropis Isolation, Purification, and Toxicity Test of Bacillus thuringiensis from Cows Cage Soil Against Drosophila melanogaster*. 21, 1106–1114.
- Bayramoglu. (2019). *Produksi Hidrolisat Keratin dari Bulu Domba Limbah Industri Penyamakan Kulit Menggunakan Kombinasi Basa dan Enzim*. 4, 32–35.
- D, R., & G, G. (2019). *Produksi Hidrolisat Keratin Dari Bulu Domba Limbah Industri Penyamakan Kulit Menggunakan Kombinasi Basa Dan Enzim*. *IPTEK Journal of Proceedings Series*, 15(4), 2354–6026.
- desmelati. (2021). *PEMANFAATAN HIDROLISAT PROTEIN UDANG REBON (Acetes erythraeus) SEBAGAI PENGAWET PADA IKAN NILA SALIN (Oreochromis niloticus) SEGAR*. 3(2), 6.
- Husna Hudaya, K. (2016). *Desain Titrator Otomatis Untuk Pengukuran Dua Titrasi Secara*

- Simultan. In *Digital Repository Universitas Jember*.
- Marzuki, A. (2015). *OPTIMASI PRODUKSI KERATINASE OLEH BAKTERI Bacillus SLII-IDALAM MEDIUM i*.
- Pamungkas, B. F., Supriyadi, Murdiati, A., & Indrati, R. (2018). Ekstraksi dan Karakterisasi Kolagen Larut Asam dan Pepsin dari Sisik Haruan (*Channa striatus*) Kering. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 21(3), 513–521.
- Perikanan, F., & Dharmawangsa, U. (2020). 1). 1). 5, 186–190.
- Rahayu, S., Bata, M., & Hadi, W. (2014). Substitusi Konsentrat Protein Menggunakan Tepung Bulu Ayam yang Diolah Secara Fisiko-Kimia dan Fermentasi Menggunakan *Bacillus sp.* Mts. *Jurnal Agripet*, 14(1), 31–36. <https://doi.org/10.17969/agripet.v14i1.1202>
- Rahmawati, D., Griyanitasari, G., Kulit, B. B., Sokonandi, J., & Yogyakarta, N. (2017). *Keratin terhidrolisis yang berasal dari wol domba dari limbah penyamakan kulit industri penyamakan kulit menggunakan perhydrol BAHAN DAN METODE Bahan : Analisis data Berat keratin dan kandungan protein total Metode Percobaan ini disusun dalam rancangan ac. 33(2), 73–78.*
- Ristaningrum, D. A. K. (2020). *Isolasi dan Karakteristik Kolagen dari Kulit dan Tulang Belut Sawah (Monopterus albus)*.
- Rosaini, H., Rasyid, R., & Hagramida, V. (2015). Penetapan Kadar Protein Secara Kejdahl beberapa Makanan Olahan Kerang Remis (*Corbiculla moltkiana Prime.*) dari Danau Singkarak. *Jurnal Farmasi Higea*, 7(2), 121.
- Shah, A., Tyagi, S., Bharagava, R. N., & Belhaj, D. (2019). *Bab 2 Produksi Keratin dan Aplikasinya : Perspektif Saat Ini dan Masa Depan*. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-02901-2>
- Shah, A., Tyagi, S., Bharagava, R. N., Belhaj, D., Kumar, A., Saxena, G., Saratale, G. D., & Mulla, S. I. (2019). *Keratin Production and Its Applications: Current and Future Perspective*. *November 2018*, 19–34. https://doi.org/10.1007/978-3-030-02901-2_2
- Sivakumar, T., Shankar, T., Ramasubramanian, P. V. V., & Mikrobiologi, D. (2012). *Optimasi Produksi Enzim Keratinase Menggunakan Bacillus thuringiensis TS2 Isolasi dan Identifikasi Mikroorganisme : Sampel*. 5(3), 102–109. <https://doi.org/10.5829/idosi.ajps.2012.5.3.6279>
- Studi, P., Biologi, P., Keguruan, F., Purwokerto, U. M., Raya, J., Waluh, D., & Box, P. O. (2016). *PEMANFAATAN LIMBAH BULU AYAM MENJADI BAHAN PAKAN IKAN DENGAN FERMENTASI Bacillus subtilis (Utilization of Waste Chicken Feather to Fish Feed Ingredients Material with Fermentation of Bacillus subtilis) Dini Siswani Mulia *, Risna Tri Yuliningsih , Heri. 23(1), 49–57.*
- susanti, T. H., Pertanian, F., & Umar, U. T. (2021). *PENENTUAN KONDISI OPTIMUM PRODUKSI ENZIM KERATINASE*. 3(1), 19–24.
- Suwandi, R., & Yogaswari, V. (2010). *Nurjanah, ruddy suwandi, vanadia yogaswari. 4(2), 7–12.*