

**OPTIMASI PRODUKSI HIDROLISAT PROTEIN DARI LIMBAH BULU
AYAM MENGGUNAKAN BAKTERI ISOLAT LOKAL B-9-6**

(Skripsi)

Oleh

SALSABILLA BETHARI PURWORINI



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2023**

ABSTRAK

OPTIMASI PRODUKSI HIDROLISAT PROTEIN DARI LIMBAH BULU AYAM MENGGUNAKAN BAKTERI ISOLAT LOKAL B-9-6

Oleh

Salsabilla Bethari Purworini

Peningkatan jumlah pemotongan ayam ras pedaging yang mengakibatkan jumlah limbah bulu ayam dan berpotensi mengakibatkan pencemaran lingkungan. Kandungan protein berupa keratin dalam bulu ayam berpotensi untuk dimanfaatkan sebagai bahan baku pakan unggas. Biodegradasi bulu ayam oleh mikroba dipilih karena lebih ramah lingkungan dibandingkan proses degradasi secara kimia lainnya. Isolat B-9-6 dilaporkan sebelumnya memiliki kemampuan untuk mendegradasi limbah bulu ayam sebesar 62,52% pada medium uji FML dengan volume inokulum 5 mL, menggunakan sumber nitrogen pepton dan *yeast extract*, dan menghasilkan kadar hidrolisat protein sebesar 748 ppm. Penelitian ini bertujuan untuk mengoptimasi kondisi kultur dalam mendegradasi limbah bulu ayam menggunakan tiga sumber karbon dan tiga sumber nitrogen, mengetahui kadar asam amino yang dibebaskan, dan mengukur kadar hidrolisat protein selama proses biodegradasi oleh isolat tersebut. Uji biodegradasi dilakukan menggunakan medium FML dengan tiga variasi inokulum dan penambahan 1% sumber karbon dan nitrogen dengan waktu inkubasi 12 hari. Data persen degradasi, aktivitas enzim, kandungan asam amino yang dibebaskan, dan kadar hidrolisat protein pada kultur dikumpulkan selama penelitian ini. Hasil penelitian menunjukkan proses biodegradasi menggunakan volume inokulum 10 mL selama 12 hari dengan sumber karbon sukrosa memberikan %-degradasi sebesar 68,8% dan dengan sumber nitrogen KNO_3 sebesar 53,6%. Medium FML tanpa penambahan sumber C dan sumber N, mengizinkan isolat B-9-6 mendegradasi bulu ayam sebesar 65,71%; medium ini dipilih untuk proses kultur lebih lanjut. Pada medium tersebut diperoleh aktivitas enzim terbaik pada hari ke-8 sebesar 34,19 U/mL, kadar asam amino yang dibebaskan tertinggi pada hari ke-12 sebesar 859,27 ppm, dan kadar hidrolisat protein pada hari ke-6 sebesar 689,14 ppm. Data-data yang diperoleh membuktikan bahwa kondisi biodegradasi pada penelitian ini tidak dipengaruhi oleh penambahan sumber C dan sumber N.

Kata kunci: Limbah Bulu Ayam, Biodegradasi, Keratin, Bakteri B-9-6, Hidrolisat

ABSTRACT

OPTIMIZATION OF PROTEIN HYDROLYSATE PRODUCTION FROM CHICKEN FEATHER WASTE USING B-9-6 LOCAL BACTERIA ISOLATE

By

Salsabilla Bethari Purworini

The increase in broiler slaughterings has resulted in feather waste and can potentially cause environmental pollution. The protein content in the form of keratin in chicken feathers has the potential to be utilized as a raw material for poultry feed. Biodegradation of chicken feathers by microbes was chosen because it is more environmentally friendly than other chemical degradation processes. Isolate B-9-6 was previously reported to have the ability to degrade chicken feather waste by 62.52% on FML test medium with an inoculum volume of 5 mL, using peptone and yeast extract nitrogen sources and producing protein hydrolysate levels of 748 ppm. This study aimed to optimize culture conditions in degrading chicken feather waste using three carbon sources and three nitrogen sources, determine the levels of amino acids liberated, and measure the levels of protein hydrolysates during the biodegradation process by these isolates. Biodegradation tests were carried out using FML medium with three variations of inoculum and the addition of 1% carbon and nitrogen sources with an incubation time of 12 days. Data on percent degradation, enzyme activity, liberated amino acid content, and protein hydrolysate content of the culture were collected during this study. The results showed that the biodegradation process using an inoculum volume of 10 mL for 12 days with sucrose as carbon source gave a %-degradation of 68.8% and with a KNO₃ nitrogen source of 53.6%. FML medium without the addition of C and N sources, allowed isolate B-9-6 to degrade chicken feathers by 65.71%; this medium was chosen for further culture process. The best enzyme activity was obtained on day 8 at 34.19 U/mL, the highest liberated amino acid content on day 12 at 859.27 ppm, and protein hydrolysate content on day 6 at 689.14 ppm. The data obtained proved that the addition of C and N sources did not influence the biodegradation conditions in this study

Keyword: *Chicken Feather Waste, Biodegradation, Isolate B-9-6, Protein Hydrolyzate*

**OPTIMASI PRODUKSI HIDROLISAT PROTEIN DARI LIMBAH BULU
AYAM MENGGUNAKAN BAKTERI ISOLAT LOKAL B-9-6**

Oleh

Salsabilla Bethari Purworini

(Skripsi)

Sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar
SARJANA SAINS

Pada Jurusan Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2023**

Judul : **OPTIMASI PRODUKSI HIDROLISAT PROTEIN
DARI LIMBAH BULU AYAM MENGGUNAKAN
BAKTERI ISOLAT LOKAL B-9-6**

Nama : **Salsabilla Bethari Purworini**

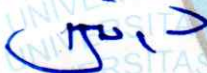
NPM : **1817011012**


Jurusan : **Kimia**

Fakultas : **Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**



1. **Komisi Pembimbing**


Mulyono, Ph.D.
NIP. 197406112000031002


Dr. Nurhasanah, M.Si.
NIP. 197412111998022001

2. **a.n Ketua Jurusan
Sekretaris Jurusan Kimia FMIPA
Universitas Lampung**


Dr. Mita Rilyanti S.Si., M.Si
NIP 197205302000032001

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

Ketua : Mulyono, Ph.D.



Sekretaris : Dr. Nurhasanah, S.Si., M.Si.



**Penguji
Bukan Pembimbing : Syaiful Bahri, S.Si., M.Si.**



2. plt. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



**Dr. Eng. Heri Satria, M.Si.
NIP. 197110012005011002**

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 10 Februari 2023

**SURAT PERNYATAAN
KEASLIAN SKRIPSI**

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Salsabilla Bethari Purworini
Nomor Pokok Mahasiswa : 1817011012
Jurusan : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa skripsi saya berjudul **“PRODUKSI HIDROLISAT PROTEIN DARI LIMBAH BULU AYAM MENGGUNAKAN BAKTERI ISOLAT LOKAL B-9-6”** adalah benar hasil karya saya sendiri, baik ide, hasil penelitian, maupun analisisnya.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan penuh kesadaran untuk dapat digunakan sebagaimana mestinya.

Bandar Lampung, 10 Februari 2023
Yang menyatakan,



Salsabilla Bethari Purworini
NPM1817011012

RIWAYAT HIDUP



Penulis bernama Salsabilla Bethari Purworini lahir di Bandar Lampung, 01 Oktober 2000. Penulis merupakan putri dari pasangan Bapak Purwo Prayitno dan Ibu Sundari. Penulis merupakan anak pertama dari dua bersaudara.

Penulis menempuh pendidikan di TK Ikatan Kekeluargaan Ibu-Ibu PT. Perkebunan Nusantara VII (Persero) Pusat Bandar Lampung pada tahun 2006, SD Negeri I Rajabasa Raya Bandar Lampung pada tahun 2012, SMP Negeri 20 Bandar Lampung pada tahun 2015, dan Sekolah Menengah Atas di SMA Al-Azhar 3 Bandar Lampung pada tahun 2018. Penulis diterima sebagai mahasiswa Jurusan Kimia Universitas Lampung melalui jalur Seleksi Nasional Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SNMPTN) pada tahun 2018.

Selama studi di Jurusan Kimia, penulis mengikuti organisasi di Himpunan Mahasiswa Jurusan Kimia (Himaki) sebagai anggota Biro Usaha Mandiri (BUM) kepengurusan tahun 2019-2020. Selama kepengurusan penulis aktif mengikuti kegiatan yang diadakan himpunan. Selama menjadi mahasiswi penulis pernah menjadi asisten praktikum Biokimia pada tahun 2022. Pada tahun 2021, penulis mengikuti Kuliah Kerja Nyata (KKN) di Rajabasa Raya, Kecamatan Rajabasa Raya, Kota Bandar Lampung. Pada tahun 2022 penulis melakukan Praktik Kerja Lapangan (PKL) di Laboratorium Biokimia Jurusan kimia FMIPA Universitas Lampung. Penulis menyelesaikan Skripsi yang berjudul “Optimasi Produksi Hidrolisat Protein Dari Limbah Bulu Ayam Menggunakan Bakteri Isolat Lokal B-9-6”.

MOTTO

“Jangan pernah mengeluh atas apa yang terjadi dalam hidupmu, Allah selalu tau yang terbaik untukmu. Bersyukurlah dan percayalah Allah tidak akan memberikan ujian melebihi batas kemampuan Hambanya”

(Penulis)

“Hatiku tenang karena mengetahui bahwa apa yang melewatkanmu tidak akan pernah menjadi untukmu, dan apa yang ditakdirkan untukmu tidak akan pernah melewatkanmu”

(Umar bin Khattab)

“Sesungguhnya bersama kesulitan pasti ada kemudahan”

(Q.S. Al-Insyirah : 5)

“Perbanyak bersyukur, kurangi mengeluh, buka mata, jembarkan telinga, perluas hati. Sadari kamu ada pada sekarang, bukan kemarin atau besok dan nikmati setiap momen hidupmu”

(Ayu Estiningtyas)

“Yakinlah ada sesuatu yang menantimu setelah sekian banyak kesabaran (yang kau jalani), yang akan membuatmu terpana hingga kau akan lupa betapa pedihnya rasa sakit”

PERSEMBAHAN

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Dengan menyebut nama Allah Yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang

Dengan mengucap *Alhamdulillahillobbil 'alamin* atas ridho Allah dengan segala rasa syukur kupersembahkan karya kecil ini kepada :

Keluargaku tercinta

Papah, Ibu, Bude, Pakpuh, Mamak, Adek dan semua keluarga besarku yang telah mendo'akan dan mendukung penulis

Dengan rasa hormat kepada:

Bapak Mulyono, Ph.D., Ibu Dr. Nurhasanah, S.Si., M.Si., Bapak Syaiful Bahri, S.Si., M.Si., serta seluruh Dosen Kimia FMIPA Unila yang telah membimbing dan memberikan ilmu serta nasehatnya hingga penulis mencapai gelar sarjana.

Sahabat-sahabatku dan semua orang baik yang telah mendo'akan dan memberi semangat

Almamater Universitas lampung

Dan untuk diriku sendiri yang telah kuat berjuang hingga mencapai gelar sarjana

SANWACANA

Puji dan syukur kehadirat Allah Subhanahu wa ta'ala atas segala rahmat dan karunia yang diberikan sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Optimasi Produksi Hidrolisat Protein Dari Limbah Bulu Ayam Menggunakan Bakteri Iaolat Lokal B-9-6”**. Sholawat serta salam selalu tercurahkan kepada junjungan kita Nabi Muhammad *Shalallahu 'alaihi wassalam*, beserta keluarga dan para sahabatnya.

Skripsi ini dapat terselesaikan tidak lepas dari bimbingan dan bantuan dari banyak pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada :

1. Kedua orang tua penulis, Bapak Purwo Prayitno dan Ibu Sundari yang telah kuat dan yang selalu mendo'akan, mendengarkan keluh kesah, memberikan motivasi, memberikan kasih sayang serta semangat penulis selama perkuliahan dan dalam menyelesaikan skripsi.
2. Bude, Pakpuh dan Mamak yang selalu mendo'akan dan memberikan semangat penulis dalam menyelesaikan skripsi.
3. Adik, serta Keluarga Besarku yang telah mendo'akan, mendengarkan keluh kesah, dan memberikan semangat penulis dalam menyelesaikan skripsi.
4. Bapak Mulyono, Ph.D., selaku pembimbing utama dan Ketua Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung yang telah banyak memberikan ilmu pengetahuan, bimbingan, bantuan, dukungan, semangat, kritik dan saran kepada penulis dalam proses pelaksanaan penelitian serta dalam penulisan skripsi ini.

Ditengah kerjaan dan kesibukan yang padat, bapak dengan sabar dan ikhlas membimbing.

5. Ibu Dr. Nurhasanah, S.Si., M.Si., selaku pembimbing dua yang telah memberikan bimbingan, kritik dan saran, serta memberikan semangat kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi.
6. Bapak Syaiful Bahri, S.Si., M.Si., selaku pembahas yang telah memberikan bimbingan, kritik dan saran, serta memberikan masukan kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi.
7. Ibu Rinawati, Ph.D. selaku Pembimbing Akademik (PA) yang telah sabar memberikan bimbingan, nasehat, serta semangat kepada penulis selama menempuh Pendidikan di Jurusan Kimia FMIPA Unila.
8. Seluruh dosen Kimia FMIPA Unila yang telah mendidik, menasehati dan memberikan ilmu pengetahuan kepada penulis selama kuliah.
9. Salsabila teman terbaikku terimakasih sudah selalu ada di saat senang maupun susah dan selalu menemani penulis selama perkuliahan sampai sekarang, selalu mendengarkan keluh kesah penulis selama perkuliahan, memberikan semangat, mendo'akan, serta menguatkan penulis. Makasih ya sa udah mau nemenin kemanapun kapanpun dan selalu ada.
10. Alya Ika Nur Afifah dan Alhuda Fidyati terimakasih telah mendo'akan, memberikan semangat, yang selalu mau direpotkan dalam hal apapun serta dukungan kepada penulis.
11. Yanesta Oxvyena dan Vezhia Sheiscatamya terimakasih telah memberikan semangat, mendo'akan, menguatkan serta memberikan motivasi kepada penulis.
12. Aprilia Fransiska Br Sembiring terimakasih sudah mau berjuang bersama serta meberikan semangat kepada penulis selama penelitian dan menyusun skripsi. Makasih ya April.
13. Teman-teman angkatan 2018 yang telah memberikan semangat serta mendo'akan kepada penulis selama perkuliahan dan menyusun skripsi.

14. Untuk Teman-Teman Biokimia 2018 terimakasih atas kebersamaan dan semangat nya selama bekerja di Laboratorium.
15. The last one untuk diri saya sendiri terimakasih telah berjuang, udah kuat, dan optimis sampai berada di titik ini dan mendapatkan gelar Sarjana Sains telah kuat berjuang penelitian walaupun ada menangisnya tapi saya tetap kuat dan semangat sampai dititik ini.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih terdapat kekurangan baik dalam isi maupun cara penyajian. Oleh karena itu, penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun untuk perbaikan di masa mendatang. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi penulis khususnya dan bagi pembaca pada umumnya. Aamiin.

Bandar Lampung, Maret 2023

Penulis

Salsabilla Bethari Purworini

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR GAMBAR.....	vii
DAFTAR TABEL	viii
I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Tujuan Penelitian.....	3
1.3. Manfaat Penelitian.....	4
II. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1. Bulu Ayam	5
2.2. Limbah Bulu Ayam.....	6
2.3. Keratin.....	8
2.4. Enzim Keratinase.....	9
2.5. Mikroba Keratinolitik	10
2.6. Mikroba Pendegradasi Keratin	11
2.7. Biodegradasi.....	12
III. METODE PENELITIAN.....	15
3.1. Waktu dan Tempat Penelitian.....	15
3.2. Alat dan Bahan.....	15
3.3. Prosedur Penelitian.....	16
3.3.1. Tahap Persiapan.....	16
3.3.2. Peremajaan Bakteri.....	17
3.3.3. Pembuatan Inokulum (Starter) Mikroba.....	17
3.3.4. Uji Biodegradabilitas Limbah Bulu Ayam.....	18

3.3.5. Variasi Sumber Karbon (C)	18
3.3.6. Variasi Sumber Nitrogen (N).....	19
3.3.7. Penentuan Kurva Pertumbuhan	19
3.3.8. Pengukuran Aktivitas Enzim	19
3.3.9. Kadar Asam Amino Yang Dibebaskan.....	20
3.3.10. Penentuan Kadar Hidrolisat Protein	20
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	21
4.1. Tepung Bulu Ayam	21
4.2. Isolat B-9-6.....	22
4.3. Pembuatan Inokulum Isolat B-9-6	23
4.4. Biodegradabilitas Limbah Bulu Ayam	24
4.5. Biodegradabilitas Limbah Bulu Ayam dengan Penambahan Sumber Karbon ...	27
4.6. Biodegradabilitas Limbah Bulu Ayam dengan Penambahan Sumber Nitrogen .	29
4.7. Kurva Pertumbuhan Bakteri Isolat B-9-6.....	30
4.8. Aktivitas Enzim Keratinase.....	32
4.9. Kadar asam Amino yang dibebaskan oleh Bakteri B-9-6.....	35
4.10.Kadar Hidrolisat Protein pada Kultur Oleh Isolat B-9-6.....	36
V. SIMPULAN DAN SARAN.....	39
5.1. Simpulan	39
5.2. Saran	39
DAFTAR PUSTAKA	40
LAMPIRAN	45

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Morfologi Bulu Ayam (Saravanan <i>and</i> Dhurai, 2012)	5
2. Struktur keratin	8
3. Bulu ayam kasar yang telah melalui proses delipidasi	21
4. Tepung bulu ayam yang telah digiling.....	22
5. Isolat B-9-6 yang telah diremajakan	23
6. Starter bakteri isolat B-9-6.....	23
7. Kurva pertumbuhan bakteri isolat B-9-6	31
8. Kurva aktivitas enzim keratinase isolat B-9-6	33
9. Kurva asam amino yang dibebaskan isolat B-9-6.....	36
10. Kurva kadar hidrolisat protein pada kultur oleh isolat B-9-6	38
11. Kurva standar tirosin.....	50
12. Kurva standar BSA	53

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Perbandingan kandungan asam amino pada tepung bulu ayam, tepung ikan, dan bungkil kedelai (Marzuki, 2015).....	7
2. Hasil kemampuan degradasi oleh Isolat B-9-6 dengan variasi inokulum.....	25
3. Perbandingan hasil biodegradasi limbah bulu ayam pada beberapa penelitian. ..	26
4. Hasil kemampuan degradasi bulu ayam pada penambahan sumber karbon dengan variasi inokulum 5 mL.	27
5. Hasil kemampuan degradasi limbah bulu ayam pada penambahan sumber karbon dengan variasi inokulum 10 mL.	27
6. Hasil kemampuan degradasi limbah bulu ayam pada penambahan sumber karbon dengan variasi inokulum 20 mL.	28
7. Hasil uji degradasi bulu ayam dengan penambahan sumber nitrogen pada sumber karbon sukrosa.	29
8. Hasil uji degradasi bulu ayam dengan penambahan sumber nitrogen pada sumber karbon laktosa.	30
9. Perhitungan persen degradasi pada variasi inokulum selama 12 hari.....	46
10. Perhitungan persen degradasi pada sumber karbon (C) selama 12 hari pada volume inokulum 5 mL.....	46
11. Perhitungan persen degradasi pada sumber karbon (C) selama 12 hari pada volume inokulum 10 mL.....	47
12. Perhitungan persen degradasi pada sumber karbon (C) selama 12 hari pada volume inokulum 20 mL.....	47

13. Perhitungan persen degradasi pada penambahan sumber nitrogen dalam sumber karbon sukrosa selama 12 hari.....	48
14. Perhitungan persen degradasi pada penambahan sumber nitrogen dalam sumber karbon Laktosa selama 12 hari.....	48
15. Perhitungan nilai Optical Density	49
16. Nilai absorbansi tirosin pada berbagai konsentrasi , diukur pada λ 280 nm.....	50
17. Data nilai absorbansi, kadar tirosin, aktivitas unit enzim keratinase isolat B-9-6 yang diukur pada λ 280 nm.....	51
18. Perhitungan kadar asam amino yang dibebaskan	52
19. Nilai absorbansi BSA pada berbagai konsentrasi, diukur pada λ 750 nm	53
20. Perhitungan nilai absorbansi kadar hidrolisat protein.....	54

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Produksi daging ayam ras pedaging di Indonesia dari tahun ke tahun terus meningkat seiring dengan bertambahnya jumlah penduduk. Berdasarkan data dari Badan Pusat Statistik pada tahun 2021 produksi daging ayam ras pedaging di Indonesia mencapai 4.034.794 Ton. Provinsi Lampung sendiri pada tahun 2021 produksi daging ayam ras pedaging mencapai 103.927 Ton. Peningkatan produksi pemotongan ayam tersebut tidak diiringi dengan pengolahan limbah yang baik. Salah satu limbah yang dihasilkan adalah limbah bulu ayam. Limbah bulu ayam tersebut hanya sebagian kecil saja yang dimanfaatkan sementara sisanya dibuang begitu saja ke lingkungan sekitar pemotongan ayam. Hal ini, dapat menimbulkan pencemaran lingkungan seperti timbulnya bau yang tidak sedap serta dapat menimbulkan berbagai penyakit dan mengganggu kesehatan hewan maupun manusia (Periasamy *and* Subash., 2004). Menurut Zerdani *et al.* (2004) dari hasil pemotongan setiap ekor ayam diperoleh bulu sebanyak kurang lebih 6% dari bobot hidupnya, sedangkan menurut Sa'dah dkk. (2013) sekitar 4-5% dari bobot hidup ayam pedaging adalah bulu. Jika rata-rata bobot panennya sebesar 1,6 Kg, maka setiap ekor ayam dapat menghasilkan 0,064 – 0,096 Kg bulu. Dengan demikian, jumlah limbah bulu yang dihasilkan per tahun sangat besar.

Menurut Adiati dkk. (2004) kandungan protein yang ada pada bulu ayam sangat tinggi yaitu sekitar 80-90% dari bahan kering, melebihi kandungan protein kasar dari

bungkal kedelai (42,5%) dan tepung ikan (66,5%). Zerdani *et al.* (2004) melaporkan komposisi kimia tepung bulu ayam yang belum difermentasi adalah 81% protein, 1,2% lemak, 86% bahan kering dan 1,3% abu. Menurut Saravanan *and* Dhurai (2012) bulu ayam mengandung protein dalam bentuk keratin yang sangat tinggi, yaitu sebesar 91% (sisanya 8% air dan 1% lemak). Kandungan protein yang tinggi pada bulu ayam dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku tambahan pakan unggas yang harganya jauh lebih terjangkau dan sehat.

Menurut Marzuki (2015) keratin terdiri dari komponen ikatan sistin disulfida, ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik molekul keratin. Larasati (2015) menyatakan bahwa keratin terdiri atas sejumlah asam amino yang sebagian besar adalah sistin, prolin, dan serin. Asam-asam amino berikatan saling silang membentuk ikatan disulfida dan hidrogen. Keratin memiliki struktur yang sulit terdegradasi, karena mengandung seleroprotein dan ikatan sistein sehingga mampu menghambat kerja enzim proteolitik dan memiliki sifat yang sukar bereaksi dengan sebagian besar bahan kimia (Kanchana, 2012). Oleh sebab itu, dibutuhkan enzim protease khusus untuk menguraikan struktur tersebut yaitu enzim keratinase.

Enzim keratinase merupakan enzim protease spesifik yang dapat mendegradasi keratin. Menurut Suntronsuk *et al.* (2004) enzim keratinase adalah enzim ekstraseluler yang digunakan untuk biodegradasi keratin. Ghaffar *et al.* (2018) menjelaskan bahwa enzim keratinase efektif dalam mendegradasi keratin pada bulu ayam menjadi hidrolisat protein. Sun *and* Lee (2001) menyatakan bahwa keratinase merupakan kelompok enzim protease yang dapat menghidrolisis keratin dengan memecah ikatan sistin disulfida pada keratin, sehingga berperan penting dalam merombak keratin menjadi protein yang sederhana. Enzim keratinase dapat dihasilkan dari beberapa mikro-organisme, seperti *Bacillus subtilis*, *Actinomyces* dari genus *Streptomyces* dan *Aspergillus* (Balakrishnan *and* Padmanabhan, 2019). Proses biodegradasi limbah bulu ayam dengan menggunakan enzim keratinase menjadi salah satu pilihan metode yang paling tepat dan dianggap ramah lingkungan (Zerdani *et al.*, 2004). Menurut Balakrishnan *and* Padmanabhan (2019) bahwa degradasi bulu ayam

dengan menggunakan bakteri yang telah diisolasi dan dimurnikan dianggap sebagai metode yang lebih efektif untuk mengubah keratin menjadi asam amino. Degradasi bulu ayam akan menghasilkan asam amino yang penting sehingga dapat digunakan sebagai bahan baku tambahan dalam pakan unggas.

Penelitian dengan topik mikroba pendegradasi bulu ayam telah dilakukan sebelumnya di Laboratorium Biokimia FMIPA Unila. Kurniasih (2022) berhasil menguji isolat bakteri B-9-6 yang mampu mendegradasi bulu ayam sebesar 62,25% selama 12 hari inkubasi dan menghasilkan konsentrasi hidrolisat asam amino sebesar 748 ppm. Namun demikian, persen degradasi yang dihasilkan masih rendah sehingga perlu dilakukan upaya untuk meningkatkan % degradasi dengan waktu yang lebih singkat, sehingga kadar hidrolisat yang dihasilkan bernilai lebih besar.

Berdasarkan hasil penelitian tersebut, pada penelitian ini dilakukan optimasi produksi hidrolisat protein dari limbah bulu ayam menggunakan bakteri isolat lokal B-9-6 melalui variasi kondisi kultur yang meliputi: sumber karbon, sumber nitrogen, dan kadar asam amino yang dibebaskan setelah sampel terdegradasi oleh bakteri keratinolitik serta produksi hidrolisat protein pada media *feather meal* pada kondisi yang optimum.

1.2. Tujuan Penelitian

Tujuan dilakukannya penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. memperoleh kondisi optimum kultur bakteri isolat B-9-6 dalam mendegradasi limbah bulu ayam;
2. mengetahui pengaruh sumber karbon dan sumber nitrogen terhadap proses degradasi limbah bulu ayam;
3. mengetahui kadar asam amino yang dibebaskan selama proses biodegradasi limbah bulu ayam.

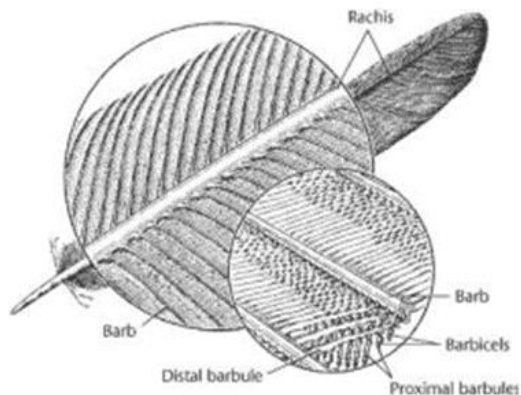
1.3. Manfaat Penelitian

Manfaat dilakukannya penelitian ini adalah untuk melihat kemampuan bakteri isolat lokal B-9-6 dalam merombak struktur keratin yang terdapat di dalam limbah bulu ayam dalam waktu yang relatif lebih singkat sehingga nantinya dapat digunakan sebagai bahan tambahan dalam pakan ternak sehingga protein yang terdapat pada limbah bulu ayam dapat digunakan dengan baik. Manfaat lainnya adalah mengurangi limbah bulu ayam yang terdapat di lingkungan pemotongan ayam.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Bulu Ayam

Bulu merupakan ciri khusus yang dimiliki oleh bangsa unggas dan berperan penting secara fisiologis dan fungsional. Bulu merupakan pembeda antara bangsa aves dengan jenis vertebrata lainnya. Bulu ayam merupakan limbah hewani yang biasanya berasal dari industri yang menggunakan ayam sebagai bahan dasarnya, misalnya saja tempat pemotongan ayam. Bulu ayam memiliki sifat yang unik, termasuk massa jenis relatif yang rendah, tingkat pemanasan yang baik, dan sifat mengisolasinya yang secara menguntungkan dapat digunakan untuk membuat sejumlah aplikasi yang dapat digunakan sebagai alternative untuk olahan makanan dari bulu dan pembuangan bulu (Rostyalina, 2015). Morfologi bulu ayam dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Morfologi Bulu Ayam (Saravanan *and* Dhurai, 2012)

Sekitar setengah dari bagian bulu ayam terdiri dari bulu halus dan setengah bagian yang lain merupakan bagian dari selubung bulu yang menjadi inti pusat bulu dengan struktur tabung hampa. Bagian bulu halus dan selubung bulu tersebut terbuat dari protein yang tidak mudah larut dalam bentuk keratin. Kandungan protein kasar bulu ayam sebesar 91% lebih tinggi dibandingkan dengan kandungan protein kasar bungkil kedelai (sebesar 42,5 %) dan tepung ikan (sebesar 66,2 %), dimana bungkil kedelai dan tepung ikan adalah komponen yang biasa dipakai dalam ransum komersial pada umumnya (Saravanan *and* Dhurai, 2012). Sehingga bulu ayam dapat dijadikan sumber alternatif ransum. Bulu ayam pada dasarnya merupakan suatu struktur epidermis yang membentuk penutup luar dari tubuh, dengan rasio kira-kira 60% dari bobot hidupnya. Bulu merupakan bagian dari kulit yang terbentuk dari proses pembiakan secara terkendali melalui aktivitas sel-sel biologi dari jaringan epidermis atau lapisan terluar dari tubuh yang didominasi oleh struktur protein keratin (Said, 2014). Adapun perbandingan tepung bulu ayam, tepung ikan, dan bungkil kedelai dapat dilihat pada Tabel 1.

2.2. Limbah Bulu Ayam

Bulu ayam merupakan limbah dari rumah pemotongan ayam (RPA) dengan jumlah berlimpah dan terus bertambah seiring meningkatnya populasi ayam dan tingkat pemotongan sebagai akibat meningkatnya permintaan daging ayam di pasar. Bulu ayam sampai saat ini belum banyak dimanfaatkan dan hanya sebagian kecil saja yang dimanfaatkan sebagai bahan untuk membuat kemoceng, pengisi jok, pupuk tanaman, kerajinan tangan/hiasan dan shuttle cock (Adiati dkk., 2004). Tercatat, Bahwa data akumulasi harian limbah bulu burung di seluruh dunia mencapai lima juta ton yang umumnya dibuang di tempat pembuangan sampah, diisi tanah atau dibakar di insinerator yang menghasilkan pencemaran lingkungan yang sangat besar (Savitha, *et al.*, 2007).

Tabel 1. Perbandingan kandungan asam amino pada tepung bulu ayam, tepung ikan, dan bungkil kedelai (Marzuki, 2015).

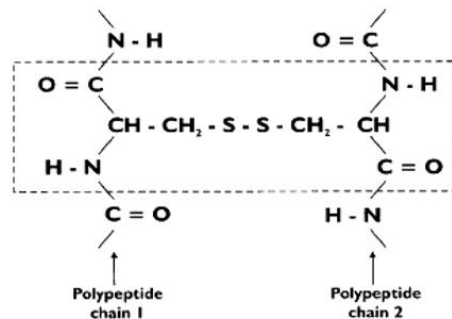
Asam amino	Tepung bulu Ayam (%)	Tepung ikan (%)	Bungkil kedelai (%)
Arginin	5,57	4,21	3,14
Histidin	0,95	1,74	1,17
Isoleusin	3,91	2,23	1,96
Leusin	6,94	5,46	3,39
Lisin	2,28	5,47	2,69
Methionin	0,57	2,16	0,26
Penilalanin	3,94	2,82	2,16
Treonin	3,81	3,07	1,72
Triptofan	0,55	0,83	0,74
Valin	5,93	3,90	0,27
Aspartat	6,00	4,41	3,06
Serin	16,00	3,57	1,20
Glutamat	12,11	7,05	3,81
Prolin	12,00	3,93	2,40
Glisin	6,92	3,83	2,65
Alanin	3,44	3,19	2,95
Sistein	8,85	0,63	0,65
Tirosin	1,10	1,59	2,60
Asparagin	4,40	3,81	2,78
Glutamin	7,62	5,32	4,49

Industri pemotongan ayam merupakan sumber limbah bulu ayam yang dapat menyebabkan pencemaran lingkungan dan gangguan penyakit bagi masyarakat sekitar jika tidak dikelola dengan baik dan juga menimbulkan penurunan kualitas tanah karena sulit terdegradasi atau proses dekomposernya cukup lama (Endah, dkk., 2015). Selain menimbulkan masalah pencemaran lingkungan, akibat lain yang dapat muncul dari kurangnya penanganan dan proses pembuangan limbah secara langsung ke lingkungan adalah dapat menimbulkan terjadinya proses infeksi yang meliputi penyakit *clorosis*, *mycoplasmosis* dan *kolera* yang umumnya terdapat pada unggas (Xu *et al.*, 2009). Menurut Saravanan (2012) limbah bulu ayam memiliki kandungan

nutrisi yang cukup tinggi, meliputi 91% protein keratin, 1% lemak, dan 8% air. Daur ulang limbah bulu ayam dapat menyediakan alternatif pakan ternak yang murah dan bergizi. Namun, kemampuan degradasi keratin yang rendah adalah masalah dalam proses pembuatan pakan ternak berbahan dasar bulu ayam (Sinoy *et al.*, 2011).

2.3. Keratin

Keratin adalah makromolekul protein dengan kestabilan yang sangat tinggi dan tingkat degradasi yang rendah. Keratin terdiri dari komponen ikatan sistin disulfida, ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik molekul keratin. Keratin adalah struktur protein tidak larut yang terdapat pada kulit hewan, tanduk, rambut, bulu domba dan bulu ayam. Keratin memerlukan enzim keratinase ekstraselular untuk proses degradasi. Keratin memiliki ikatan sistin disulfida yang terbentuk antara asam amino sistein yang mengandung gugus SH. Keratin merupakan protein serat yang tidak larut dalam air, rantai peptida pada protein keratin terbelit dalam bentuk pilin atau heliks dan saling berhubungan dengan ikatan disulfida dan ikatan hidrogen sehingga keratin sulit dicerna oleh enzim proteolitik (Marzuki, 2015).



Gambar 2. Struktur keratin

Keratin merupakan salah satu bentuk biopolimer yang paling banyak terdapat di dunia. Keratin tersusun dari protein fibrous, bersifat tidak larut dan memiliki struktur yang sangat kuat, sehingga sangat berguna sebagai lapisan terluar yang melapisi organ manusia dan hewan agar tidak mengalami proses kehilangan cairan dalam

tubuh (Bungsu, 2018). Berdasarkan struktur sekundernya, keratin dapat diklasifikasikan sebagai α -keratin (α -helix) yang umumnya ditemukan pada rambut, bulu, wool, tanduk, kuku, dan tapak hewan mamalia, sedangkan β -keratin (β -helix) memiliki sifat yang lebih keras dan umumnya ditemukan pada bulu burung, paruh, dan cakar (Gupta *and* Ramnani, 2006). Keratin terdiri atas sejumlah asam amino yang sebagian besar adalah sistin, prolin, dan serin. Asam-asam amino berikatan saling silang membentuk ikatan disulfide dan hydrogen (Larasati, 2015). Keratin memiliki struktur yang sulit terdegradasi, karena mengandung scleroprotein dan ikatan sistein sehingga mampu menghambat kerja enzim proteolitik dan memiliki sifat yang sukar bereaksi dengan sebagian besar bahan kimia, bahkan tidak dapat terurai oleh pepsin, tripsin, dan papain. Keratin juga kaya senyawa sulfur yang saling berikatan satu sama lain melalui ikatan disulfida, sehingga sulit larut secara alami dalam (Kanchana, 2012).

2.4. Enzim Keratinase

Enzim merupakan substansi yang dihasilkan oleh sel hidup dan berperan sebagai katalisator pada reaksi kimia organisme. Katalisator adalah substansi yang dapat mempercepat reaksi tetapi pada hasil reaksi, substansi tersebut tidak berubah. Aktivitas enzim sangat spesifik karena pada umumnya enzim tertentu hanya akan mengkatalisis satu reaksi (Marzuki, 2015). Keratinase merupakan enzim ekstraselular yang digunakan untuk biodegradasi keratin (Suntornsuk *et al.*, 2004).

Keratinase adalah enzim protease spesifik yang hanya dapat mendegradasi keratin (Mazotto *et al.*, 2011). Sebagian besar enzim keratinase tergolong dalam protease serin yang dicirikan dengan adanya gugus serin pada sisi aktif enzimnya dan dihambat oleh senyawa diisopropil fluorofosfat (DFP). Protease yang dihasilkan oleh mikroba ini memerlukan kofaktor Mg^{2+} dan Ca^{2+} untuk aktivitasnya (Setyabudi, 2015). Keratinase akan dihasilkan hanya jika terdapat substrat keratin. Keratinase memecahkan ikatan disulfida untuk mendegradasi keratin. Enzim keratinase

termasuk ke dalam kelompok enzim protease spesifik yang memiliki kemampuan dalam menghidrolisis keratin, sehingga memiliki banyak peranan penting dalam beberapa sektor. Keratinase saat ini menjadi salah satu enzim yang memiliki peranan sangat penting, terutama untuk aplikasinya terkait proses hidrolisis material yang tersusun atas komponen keratin, terutama produk-produk yang berasal dari proses agroindustri (Brandelli, 2008). Keratinase mempunyai kemampuan yang sangat baik dalam menurunkan kadar keratin melalui perombakan struktur jaringan kimia dinding sel, pemutusan ikatan hydrogen dan ikatan disulfida penyusun keratin (Rodriguez dkk., 2009).

Menurut (Zerdani dkk., 2004) proses biodegradasi limbah bulu ayam dengan menggunakan enzim keratinase menjadi salah satu pilihan metode yang paling tepat dan dianggap paling ramah lingkungan, selain itu enzim keratinase juga memiliki peranan penting dalam bidang bioteknologi seperti memproduksi asam amino tertentu yang mungkin sulit untuk disintesis (serin, sistein, dan prolin), peptid, industri jaket kulit, obat-obatan, pembuatan produk-produk kosmetik tertentu. Enzim keratinase juga diketahui mampu bekerja secara optimum pada pH netral hingga basa (Gupta and Ramnani, 2006).

2.5. Mikroba Keratinolitik

Mikroorganisme adalah agen biologis penghasil enzim yang paling banyak digunakan dibandingkan dengan tanaman dan hewan. Sebagai penghasil enzim, mikroorganisme lebih menguntungkan karena pertumbuhannya cepat, dapat tumbuh pada substrat yang murah, lebih mudah ditingkatkan hasilnya melalui pengaturan kondisi pertumbuhan dan rekayasa genetika, serta mampu menghasilkan enzim yang ekstrim (Kosim, 2010). Mikroba keratinolitik adalah mikroba penghasil enzim keratinase, protease spesifik yang mampu mendegradasi substrat yang mengandung keratin. Enzim keratinase ini dapat dihasilkan secara intraseluler maupun ekstraseluler oleh bakteri keratinolitik. Keratinase pada umumnya memiliki aktivitas

optimal pada pH netral hingga alkali (pH 7,0-12). Beberapa spesies bakteri menghasilkan keratinase termostabil dengan aktivitas optimal pada kisaran suhu 60-80°C (Gumulya, 2004). Enzim keratinase diketahui dapat diproduksi dari 3 kelompok mikroorganisme yaitu, bakteri, jamur dan kelompok *Actinomycetes*. Jenis mikroorganisme yang telah diketahui memiliki aktivitas keratinase yang tergolong ke dalam kelompok jamur yakni meliputi *Doratomyces microsporus*, *Alternaria radicina*, *Trichurus spiralis*, *Aspergillus sp.*, *Rhizomucor sp.*, *Absidia sp.*, *Stachybotrys alba*, kelompok *actinomycetes* yakni meliputi *Streptomyces pactum*, *S. alvs*, *S. thermoviolaceus*, *S. fradiae*, *Thermoactinomyces candidus*, dan beberapa kelompok bakteri yakni meliputi *Fervidobacterium islandicum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Microbacterium sp.*, *Bacillus licheniformis* and *B. pumilus* (Han *et al.*, 2012), *Stenotrophomonas* (Cai *et al.*, 2009), *Bacillus sp.* 50-3 (Yue *et al.*, 2011), *Aeromonas hydrophila*, *Serratia marcescens* (Bach *et al.*, 2011), *Bacillus* KD-N2 (Cai *et al.*, 2008). Ketiga jenis mikroorganisme yakni jamur, *Actinomycetes* dan bakteri, domain bakteri merupakan penghasil keratinase yang paling banyak diteliti dan paling beragam dalam memiliki kemampuan mendegradasi keratin.

2.6. Mikroba Pendegradasi Keratin

Bakteri merupakan mikroorganisme penghasil keratinase yang sudah banyak diteliti dan jenisnya beragam dengan kemampuan untuk mendegradasi keratin bila dibandingkan dengan Jamur dan *Actinomycetes*. Kumar *et al.* (2010) melaporkan pada penelitiannya bahwa spesies bakteri *Bacillus halodurans* PPKS2 banyak digunakan dalam industri deterjen dan ikat pinggang karena kemampuan toleransi dan stabilitasnya terhadap suhu dan pH tinggi pada proses pemutihan. Werlag dan Brandelli, (2005) juga melaporkan bahwa *Bacillus strain kr16* memiliki sifat yang cukup potensial dalam industri ikat pinggang karena strain tersebut mampu mendegradasi tepung bulu ayam secara sempurna.

Penelitian (Cai *et al.*, 2008) juga melaporkan bahwa pada penelitiannya mereka berhasil mengisolasi *Bacillus subtilis* KD-N2 yang telah diketahui memiliki kemampuan dalam mendegradasi kolagen dan dermis rambut sehingga sangat potensial diaplikasikan pada bidang nutrisi makanan dan pendegradasian rambut. Anitha (2012) melaporkan bahwa *Bacillus megaterium* (A1), *Bacillus licheniformis* 511 dan *Bacillus subtilis* 1-1 yang diisolasi dari tanah tempat pembuangan limbah bulu ayam Pasumalai, India memiliki aktivitas keratinase, masing-masing sebesar 72.875 U/mg, 242 U/mg dan 198 U/mg; setelah 96 jam, 48 jam dan 48 jam masa inkubasi pada suhu 35⁰C dan pH 7.5. Ekstrak kasar enzim keratinase *Bacillus licheniformis* mampu meningkatkan total asam amino pada bulu utuh dan tepung bulu komersil sebesar 7%. Masa inkubasi 2 hari menggunakan 10 gram bulu ayam dapat menghasilkan aktivitas keratinase sebesar 301.2 U/ml .

2.7. Biodegradasi

Biodegradasi merupakan proses penguraian oleh aktivitas mikroba yang mengakibatkan transformasi struktur suatu senyawa sehingga terjadi perubahan integritas molekular. Pada umumnya proses ini terjadi karena senyawa tersebut dimanfaatkan sebagai sumber nutrisi untuk tumbuh kembang mikroorganisme. Pada biodegradasi terjadi konversi yang lengkap dari bahan-bahan kimia kompleks menjadi produk-produk yang termineralisasi seperti air dan karbondioksida (Sumarsono, 2011).

Salah satunya adalah proses biodegradasi limbah bulu ayam dengan enzim keratinase, proses pendegradasian pada keratin terjadi melalui 2 tahapan utama, yakni proses deaminasi dan pemutusan ikatan disulfida. Pada proses deaminasi akan menyebabkan atau menciptakan kondisi basa yang dibutuhkan untuk membuat struktur keratin menjadi mengembang, mengalami sulfitolisis dan dilanjutkan dengan proses pemutusan ikatan protein dari keratin (Kunert, 2000), dimana sulfitolisis merupakan salah satu tahapan terpenting dalam menunjang proses keberhasilan enzim

dalam mendegradasi komponen keratin (Monod, 2008). Tahapan kedua dalam proses degradasi keratin melibatkan proses pemutusan ikatan disulfida yang terdapat pada struktur keratin tersebut sehingga terjadi perubahan struktur yang mampu mempermudah proses pemutusan ikatan antara protein dengan bantuan enzim yang dihasilkan dari kelompok bakteri proteolitik. Adapun faktor-faktor yang mempengaruhi biodegradasi adalah:

1. Substrat

Ukuran dan komponen senyawa yang menyusun substrat merupakan salah satu yang mempengaruhi degradasi. Degradasi akan berlangsung lebih cepat bila ukuran substrat lebih kecil dan senyawa penyusunnya lebih sederhana. Sebaliknya, jika ukuran substrat lebih besar dan senyawa penyusunnya lebih kompleks dibutuhkan waktu yang lebih lama untuk mendegradasinya.

2. Sumber Nitrogen

Nitrogen diperlukan karena dapat mempengaruhi aktivitas mikroba untuk menghasilkan enzim ekstraseluler. Bahan yang banyak digunakan sebagai sumber nitrogen adalah ammonium nitrat, ammonium sulfat, dan urea. Jika enzim ekstraseluler yang dihasilkan mikroba banyak, maka degradasi akan berlangsung cepat. Sebaliknya, jika enzim ekstraseluler yang dihasilkan mikroba sedikit, maka degradasi akan berlangsung lama.

3. pH

Proses degradasi, pH merupakan faktor yang sangat penting karena enzim-enzim tertentu hanya akan mengurai pada substrat sesuai dengan aktivitas pH tertentu. Umumnya mikroba menyukai pH netral atau 7 (Gandjar dkk, 2006). Jika pH sesuai dengan aktivitas enzim, maka kerja enzim ekstraseluler untuk degradasi substrat akan optimal.

4. Suhu

Selain pH, suhu juga mempengaruhi kerja enzim untuk mendegradasi substrat. Peningkatan suhu menyebabkan energi kinetik pada molekul substrat dan enzim meningkat. Namun suhu yang terlalu tinggi akan menyebabkan kerusakan pada enzim yang biasa disebut denaturasi, sedangkan suhu yang terlalu rendah dapat menghambat kerja enzim. Bila kerja terhambat atau struktur enzim rusak, amka degradasi tidak dapat berlangsung dengan baik.

5. Kelembaban

Kelembaban merupakan faktor penting yang dapat mempengaruhi pertumbuhan mikroba, biosintesis, dan sekresi enzim. Kelembaban yang rendah menyebabkan berkurangnya kelarutan nutrisi di dalam substrat dan derajat pertumbuhan rendah. Sedangkan level kelembaban yang lebih tinggi dapat menyebabkan berkurangnya enzim yang dihasilkan karena dapat mereduksi porositas (jarak interpartikel) pada matriks padatan, sehinga menghalangi transfer oksigen. Jika jumlah enzim berkurang, maka proses degradasi akan berlangsung lebih lama (Dias *et al.*, 2007).

III. METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan April sampai November 2022 di Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.

3.2. Alat dan Bahan

Adapun alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah spektrofotometer UV-Vis (Hitachi U 2010), Autoklaf (model S-90N), *Shaker Incubator (orbit environ shaker)*, *Centrifuge*, *Laminar Air Flow* CURMA model 9005-FL, *magnetic stirrer* STUART (*stir* CB161 dan *heat-stir*-CB162), lemari pendingin, thermometer, pH meter, *mikropipet (eppendorf)*, vortex, kuvet, mesin penggiling, alat-alat gelas, rak tabung, jarum ose, pembakar spirtus, spatula.

Adapun bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tepung bulu ayam, bulu ayam kasar yang didapatkan dari RPA (Rumah Pemotongan Ayam), kloroform, metanol, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, NH_4Cl , NaCl , agar, *yeast extract*, *yeast* agar, pepton, NaOH , HCl , kertas pH, *buffer phospat*, buffer asam sitrat, buffer asam aminoasetat, kasein, sukrosa, glukosa, fruktosa, Na_2CO_3 , *Nutrient Agar* (NA), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1%, larutan Na/K tartarat 1% reagen *folin ciocalteu*, BSA, tirosin, TCA, alkohol, akuades, *aluminium foil*, kertas saring, NaNO_3 , dan KNO_3 .

3.3. Prosedur Penelitian

3.3.1. Tahap Persiapan

3.3.1.1. Penyiapan Alat

Alat-alat gelas yang akan digunakan pada penelitian ini dicuci terlebih dahulu sampai bersih, kemudian dikeringkan dan disterilisasi agar alat-alat tersebut terhindar dari mikroorganisme yang tidak diinginkan. Sterilisasi dilakukan dengan menggunakan alat autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit.

3.3.1.2. Pembuatan Tepung Bulu Ayam

Bulu ayam yang diperoleh dari RPA (Rumah Pemotongan Ayam) Karkas di daerah Untung Suropati, Bandar Lampung selanjutnya dilakukan tahap delipidasi dengan cara mencuci bersih menggunakan deterjen, kemudian disaring menggunakan penyaring agar bulu tidak terlalu banyak menyerap air. Selanjutnya, bulu ayam dikeringkan dengan oven selama 24 jam pada suhu 60°C. Proses berikutnya bulu ayam direndam menggunakan campuran metanol dan kloroform dengan perbandingan 1:1 selama 24 jam. Kemudian, campuran metanol dan kloroform dipisahkan dari bulu ayam, selanjutnya bulu ayam dikeringkan kembali dengan oven selama 24 jam. Proses selanjutnya bulu ayam digiling sampai menjadi tepung bulu ayam yang halus (Kurniasih, 2022).

3.3.1.3. Pembuatan Medium *Feather Meal Liquid* (FML)

Pembuatan medium *Feather Meal Liquid* (FML) dilakukan dengan mencampurkan 1 g tepung bulu ayam, 0,05 g NaCl; 0,04 g K₂HPO₄; 0,03 g KH₂PO₄; 0,01 g MgSO₄.6H₂O; 0,1 g ekstrak ragi; dan pepton 1 % dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 mL, kemudian dilarutkan dengan akuades sebanyak 100 mL. Tahap

Selanjutnya, Media disterilisasi menggunakan *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm (Anggraini, 2018). Fungsi penambahan pepton digunakan untuk meningkatkan kemampuan mikroba dalam menghasilkan enzim keratinase (Balakumar *et al.*, 2013).

3.3.1.4. Pembuatan Medium *Nutrient Agar* (NA)

Pembuatan medium *nutrient agar* (NA) dilakukan dengan cara menimbang 2,8 gram NA lalu dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 mL, kemudian dilarutkan dengan aquades sebanyak 100 mL. Lalu, dipanaskan sampai mendidih. Selanjutnya, media disterilisasi menggunakan autoclave selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm. Kemudian, medium dituangkan dalam cawan petri atau tabung reaksi yang steril, dilakukan dalam keadaan aseptis pada *Laminar Air Flow* (LAF). Medium pada tabung reaksi dimiringkan, lalu didiamkan pada suhu kamar hingga memadat.

3.3.2. Peremajaan Bakteri

Isolat bakteri B-9-6 tersimpan di laboratorium dalam bentuk sediaan medium padat Agar miring. Peremajaan dilakukan dengan cara menggoreskan 1 ose isolat stok pada media Agar miring *Nutrient Agar* (NA) baru pada tabung reaksi dengan pola zig-zag, kemudian di inkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Peremajaan ini dilakukan untuk memperoleh biakan bakteri untuk jumlah yang banyak dan aktif.

3.3.3. Pembuatan Inokulum (Starter) Mikroba

Sebanyak 1 ose isolat bakteri B-9-6 yang telah diremajakan diinokulasikan pada 50 mL medium FML dalam Erlenmeyer 250 mL. Selanjutnya diinkubasi selama 16-18 jam menggunakan *Shaker Incubator* dengan kecepatan 120 rpm.

3.3.4. Uji Biodegradabilitas Limbah Bulu Ayam

0,5 gram bulu ayam kasar dimasukkan ke dalam 3 tabung Erlenmeyer 250 ml yang telah berisi media FML (*Feather Meal Liquid*) tanpa bulu, selanjutnya disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah didinginkan pada suhu ruang, inokulum mikroba ditambahkan pada masing-masing Erlenmeyer dengan variasi volume sebanyak 5 mL, 10 mL, 20 mL. Kemudian campuran diinkubasi menggunakan shaker dengan kecepatan 120 rpm dan suhu 35°C selama 12 hari dan disampling pada 3, 6, 9 dan 12 hari. Kemudian, sisa bulu pada kultur dipisahkan dengan cara disaring menggunakan kertas saring dan dikeringkan menggunakan oven pada suhu 60°C selama 24 jam, dan ditimbang hingga diperoleh berat konstan. Kontrol juga disiapkan dengan perlakuan yang sama tanpa penambahan isolat mikroba. Kemampuan isolat dalam mendegradasi bulu ayam dapat dihitung dengan mengukur selisih berat kering sampel (penambahan mikroorganisme) dengan berat kontrol (tanpa penambahan mikroorganisme). Apabila terjadi degradasi pada bulu ayam oleh mikroorganisme keratinolitik maka berat kering sampel akan berkurang dibandingkan berat awal. Berkurangnya berat kering sampel dapat dihitung sebagai persentase degradasi sedangkan sampel yang tidak terdegradasi dihitung sebagai persentase sisa substrat (Anggraini, 2018).

3.3.5. Variasi Sumber Karbon (C)

Optimasi sumber karbon (C) dilakukan dengan menambahkan 1% glukosa, 1% sukrosa atau 1% fruktosa dalam pH 7 dan waktu inkubasi yang telah diperoleh dari tahap sebelumnya.

3.3.6. Variasi Sumber Nitrogen (N)

Setelah didapatkan kondisi sumber karbon (C) dan konsentrasi terbaik, pH 7, dan waktu inkubasi, kemudian dilakukan variasi sumber Nitrogen (N) dengan menambahkan 1% NH_4Cl , 1% KNO_3 , 1% NaNO_3 , dan juga ditambahkan dengan sumber karbon (C) yang telah didapatkan pada tahap sebelumnya.

3.3.7. Penentuan Kurva Pertumbuhan

Pertumbuhan mikroba dinyatakan sebagai OD (*Optical Density*). Pengukuran OD dilakukan dengan cara melakukan sampling kultur setiap hari setiap 24 jam sekali. Sebanyak 0,3 mL kultur diencerkan dengan menambahkan 2,7 mL akuades steril lalu dihomogenkan. Kemudian dimasukkan ke dalam kuvet, lalu diukur serapannya menggunakan Spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 600 nm. Sedangkan untuk blanko digunakan aquades.

3.3.8. Pengukuran Aktivitas Enzim

Pengukuran aktivitas enzim dilakukan dengan 1 % kasein sebagai substrat dalam 0,5 mL 100 mM buffer Tris-HCl (pH 8,5) ditambahkan 0,5 mL supernatan diinkubasi dalam penangas air pada suhu 60°C selama 15 menit, kemudian reaksi enzim dihentikan dengan menambahkan asam trikloroasetat (TCA). Selanjutnya larutan disentrifugasi selama 15 menit dan dilakukan pengukuran pada panjang gelombang 280 nm. Pengukuran dilakukan untuk mengetahui berapa jumlah enzim yang diperlukan untuk melepaskan 1 gram tirosin per menit (Kembhavi *et al.*, 1993).

3.3.9. Kadar Asam Amino Yang Dibebaskan

Pengukuran kadar asam amino yang dibebaskan diukur dengan cara menambahkan 0,3 mL sampel, yang telah disentrifugasi lalu ditambahkan 2,7 mL akuades. Kontrol diperlakukan sama dengan cara mengambil 0,3 mL media FML tanpa penambahan isolat yang telah disentrifugasi lalu ditambahkan 2,7 mL akuades. Kemudian, diukur nilai absorbansi nya menggunakan Spektrofotometer Uv-Vis dengan Panjang gelombang 280 nm.

3.3.10. Penentuan Kadar Hidrolisat Protein

Penentuan kadar hidrolisat protein dilakukan menggunakan metode Lowry dengan Bovine Serum Albumin (BSA) sebagai larutan standar diukur nilai absorbansinya menggunakan spektrofotometer Uv-Vis dengan Panjang gelombang 750.

V. SIMPULAN DAN SARAN

5.1. Simpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan maka dapat diperoleh kesimpulan sebagai berikut:

1. Kondisi optimum kultur isolat B-9-6 dalam mendegradasi bulu ayam diperoleh volume inokulum 10 mL dalam waktu inkubasi 12 hari memperoleh % degradasi sebesar 65,71% meningkat sebesar 3,46%.
2. Pengaruh penambahan sumber karbon dengan variasi inokulum pada proses biodegradasi didapat % degradasi terbesar pada sumber karbon sukrosa (68,84%) dan pada sumber nitrogen KNO_3 didapat % degradasi sebesar 53,61%.
3. Uji biodegradasi menggunakan medium uji FML pada pH 7 dengan volume inokulum sebesar 20 mL oleh isolat B-9-6 diperoleh kadar asam amino tertinggi pada hari ke-12 sebesar 859,27 ppm, kadar hidrolisat protein tertinggi pada hari ke-6 sebesar 689,14 ppm, dan aktivitas enzim keratinase sebesar 34,19 U/mL pada waktu inkubasi hari ke-8.

5.2. Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dan hasil yang diperoleh maka disarankan untuk melakukan metode selain LSF (*liquid state fermentation*) guna untuk mendapatkan % degradasi yang lebih tinggi.

DAFTAR PUSTAKA

- Adiati, U., W. Puastuti dan W. Mathius. 2004. Peluang Pemanfaatan Tepung Bulu Ayam Sebagai Bahan Pakan Ternak Ruminansia. *Wartazoa*. 14 (1):39-44.
- Akhter M., Marzan L.Wal.M., Akter Y and Kazuyuki S. 2020. Microbial Bioremediation of Feather Waste for Keratinase Production: An Outstanding Solution for Leather Dehairing in Tanneries. *Microbiology Insights*. 13: 1–12
- Alahyaribeik, S., Sharifi, S. davood, Tabandeh, F., Honarbakhsh, S., and Ghazanfari, S. 2020. Bioconversion od Chicken Feather Wastes by Keratinolytic Bacteria. *Process Safety and Environmental Protection*, 135. 171-178.
- Anggraini, M. T. 2018. Isolasi dan Karakterisasi Mikroorganisme Pendegradasi Limbah Bulu Ayam serta Uji Biodegradabilitasnya. *Skripsi Universitas Lampung*, Lampung
- Anitha, A., and Eswari, R. 2012. Impact of Newly Isolated Bacillus Megaterium (A1) on Degradation of Feather Waste. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* 3(1), 212–221.
- Bach E, Daroit DJ, Correa AP, and Brandelli A. 2011. Production and Properties of Karatinolytic Protease from Three Novel Gram-Negative Feather-Degrading Bacteria Isolated from Brazilian Soils. *J Biodegradation*. 22:1191-1201.
- Badan Pusat Statistik. 2021. <https://www.bps.go.id/indicator/24/487/1/produksi-daging-ayam-ras-petelur-menurut-provinsi.html>.
- Balakrishnan, D., and Padmanabhan, N.S. 2019. Identification and Phylogenetic Analysis of Keratinase Producing Bacteria SNP 1 from Poultry. *International Journal of Biotechnology and Biochemistry* 15(1). 39-51.
- Balakumar, S., Mahesh, N., Arunkumar, M., Sivakumar, R., dan Hemambujavalli, V. 2013. Optimization of Keratinase Production by Keratynolytic Organisme Under Submerged Fermentation. *International Journal of PharmTech Research*. 5(3). 1294-1300.

- Brandelli, A. 2008. Bacterial Keratinase: Useful enzymes For Bioprocessing Agroindustrial Wastes and Beyond. *Food and Bioprocess Technology*. 1(2). 105-116.
- Bungsu, A. 2018. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Keratinolitik Dari Beberapa Sumber Keratin dan Karakterisasi Enzimnya. *Skripsi*. Universitas Sumatera utara, Medan.
- Cai, C. G., Lou, B. G., and Zheng, X. D. 2008. Keratinase production and keratin degradation by a mutant strain of *Bacillus subtilis*. *Journal of Zhejiang University: Science B*. 9(1). 60–67.
- Cai C., and Zheng X. 2009. Medium Optimization for Keratinase Production in Hair Substrate by a New *Bacillus subtilis* KD-N2 Using Response Surface Methodology. *Journal Ind Microbiol Biotechnol*. 36. 875-883.
- Dias, M.O.S., Maciel and Rossell, C.E.V. 2007. Eficient Colling Of Fermentationin Ethanol Production. *Journal Internasional* . (70) hal : 11.
- Endah, P.S., Imela, S.T.P., Rinanti, A.P., Shafa, I., Dewi, E., dan Riris, L.P. 2015. Pemanfaatan Limbah Bulu Ayam Sebagai Pakan Ternak Ruminansia. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon*. 1(1). 136-138.
- Febriyansari, A. 2014. Penerapan Model Gompertz pada Pertumbuhan Bakteri *L.acidophilus* dan *B. Longum* di Media Adonan Es Krim (Ice Cream Mix atau ICM) Jenis Standar. *Skripsi*. Universitas Brawijaya. Malang.
- Gandjar, I, W., Sjamuridzal, dan Oetari, A. 2006. *Mikrobiologi Dasar dan Terapan*. Yayasan Obor Indonesia. Jakarta.
- Ghaffar, I., Imtiaz, A., Hussain, A., Javid, A., Jabeen, F., Akmal, M., and Qazi, J. I. 2018. Microbial production and industrial applications of keratinases: an overview. *International Microbiology*.
- Gumulya, Y. 2004. *Optimasi Produksi Enzim Keratinase dari Bakteri Termofilik L-23*. Asal Sulawesi Utara. Skripsi. Fakultas Teknologi Pertanian, IPB. Bogor.
- Gupta R., and Ramnani P. 2006. Microbial Keratinases and Their Prospective Applications: an overview. *J.Appl Microbiol Biotechnol*. 70: 21–33.
- Huda dan T. A. Yang. 2012. Technology for production of surimi powder and potential of applications. *International Food Research Journal*. 19(4): 1313-1323.
- Kanchana, R. 2012. Farm waste recycling through microbial keratinases. *Journal of Applied Sciences in Environmental Sanitation*. 7(2). 103–108.

- Kembhavi, A.A., Kulkarni,A., and Pant, A.1993. Salt-Tolerant and Thermostable Alkaline Protease From *Bacillus subtilis* NCIM No.64.Appl. *Biochem. Biotechnol.*38:83-92.
- Kosim, M. 2010. *Pengaruh Suhu Pada Protease dari Bacillus Subtilis*. ITS Press. Surabaya.
- Kumar, A., Panda, S., Meher, A., Padhan, A., and Khaliquzzama, M. 2010. Phytochemical Screening of *Curculigo Orchioides* Gaertn. Root tubers. *J. Chem. Pharm. Res.* 2(2).107–111.
- Kunert, J. 2000. Physiology of keratinophilic fungi. *Revista Iberoamericana de Micologia.* 17(SUPPL.). 77–85.
- Larasati, D. 2015. Modifikasi Enzimatik Limbah Bulu Ayam Sebagai Pakan Ternak Kaya Nutrisi. *Skripsi*. Institut Teknologi Sepuluh November. Surabaya
- Manirujjaman, M., Amin, R., Nahid, A. A., and Alam, M. S. 2016. Isolation and characterization of feather degrading bacteria from poultry waste. *Academic Journal.* 8:14–21.
- Maria, F., K. 2022. Produksi Hidrolisat Protein Dari Limbah Bulu Ayam Untuk Pakan Unggas. *Skripsi*. Universitas Lampung, Lampung
- Marzuki, A. R. 2015. Optimasi Produksi Keratinase Oleh Bakteri *Bacillus* SLII-I Dalam Medium Limbah Bulu Ayam. *Skripsi*. Institut Teknologi Sepuluh November. Surabaya
- Mazotto, A.M., R.R.R. Coelho, S.M.L. Cedrola, M.F. de Lima, S. Couri, E.P. de Souza and A. B. Vermelho. 2011. Keratinase Production by Three *Bacillus* spp. Using Feather Meal and Whole Feather as Substrate in a Submerged Fermentation. *Enzyme Research* 1-7.
- Monod, M. 2008. Secreted proteases from dermatophytes. In *Mycopathologia* (166, Issues 5–6, pp. 285–294).
- Pasaribu, Iwendepi, M. 2022. Optimasi Biodegradasi Limbah Bulu Ayam Menggunakan Mikroba Keratinolitik Isolat Lokal. *Skripsi*. Universitas Lampung. Lampung.
- Pasupuleti, VK., and Demain, A.L. 2010. *Protein Hydrolysates in Biotechnology*. New York (US): Springer.
- Pierce. 2005. Protein Assay: *Technical Handbook*, Pierce Biotechnology. Inc. USA.USA

- Periasamy, A.H., and Subash, C.B.G. 2004. *Keratinophilik Fungi of Poultry Fram and Father Dumping Soil In Tamil Nadu*. University of Madras. Madras.
- Realita, T. dan Debby, Sumanti. M. 2009. *Teknologi Fermentasi*. Widya padjajaran. Bandung.
- Rodriguez, M.R., Valdivia, E., Soler, J.J. Vivaldi, M.M., Martin-Platero, A.M., and Martinez-Bueno, M. 2009. Symbiotic Bacteria Living in the Hoopoe's Uropygial Gland Prevent Feather Degradation. *J. Exp. Biol.* 212:3621-3626.
- Rostyalina. 2015. Solidifikasi Zink Pada Limbah Bulu Ayam Dengan Menggunakan Semen Portland. *Skripsi*. Universitas Negeri Yogyakarta. Yogyakarta.
- Said, M. I. 2014. *By Product Ternak. Teknologi dan Aplikasinya*. Bogor: IPB Press.
- Sa'adah, N., Hastuti, R., dan Prasetya, N. 2013. Pengaruh Asam Formiat Pada Bulu Ayam Sebagai Adsorben Terhadap Penurunan Kadar Larutan Zat Warna Tekstil Remazol Golden Yellow Rnl. *Chem Info.* 1(1), 202–209.
- Saravanan, K., and Dhurai, B. 2012. Exploration on amino acid content and morphological structure in chicken feather fiber. *Journal of Textile and Apparel, Technology and Management.* 7(3), 1–6.
- Savitha, G. Joshi, M.M., Tejashwini, N., Revati, R., Sridevi, S., and Roma, D. 2007. Isolation, Identification and Characterization of a Feather Degrading Bacterium. *International Journal of Poultry Science.* 6(9):689-693.
- Setyabudi, Rizki B. 2015. Aktivitas Keratinolitik *Aspergillus niger* Pada Tepung Bulu Ayam Menggunakan Solid State Fermentation (SSF). *Skripsi*. Universitas Jember. Jember
- Sinoy, Tom E.S, Bhausahab, Chavaan Pooja and Pratiksha, Patre Rajendra. 2011. *Isolation and Identification of Feather Degradable Microorganism*. VSRD-TNTJ 2:128-136.
- Siswa, S., dan Puji, R. 2012. Protease dari *Bacillus sp* sebagai Pendegradasi Bulu Ayam untuk Pembuatan Tepung Bulu. *Jurnal Bidang Teknologi Biokatalis.* 8(1): 59-66.
- Subagiyo, Sebastian, M., dan Triyanto. 2015. Pengaruh Penambahan Berbagai Jenis Sumber Karbon, Nitrogen dan Fosfor pada Medium deMan, Rogosa and Sharpe (MRS) Terhadap Pertumbuhan Bakteri Asam Laktat Terpilih Yang Diisolasi Dari Intestinum Udang Penaeid. *Jurnal Kelautan Tropis.* 18(3). Hal. 127-132.

- Suharti, Arinta Agni Dewantari, dan Nurlaili Lisdiyarni. 2017. Pemekatan Keratinase dari *Bacillus sp.* 24 untuk Meningkatkan Aktivitas *Dehairing*. *Journal Cis-Trans (JC-T)*. 1(2).
- Suhartono MT. 2000. Eksplorasi Protease Bakteri Asal Indonesia untuk Aplikasi Industri dan Riset Bioteknologi, *Prosiding Seminar Nasional Industri Enzim dan Bioteknologi II*. 125-133.
- Sun, H.J., H.K., Lee. 2001. Characterization of a Keratinolytic Serine Protease from *Bacillus subtilis* KS-1. *Journal Protein Chemistry*. 20:165-169.
- Suntornsuk W, Tongjun J, Onnim P, Oyama H, Ratanakanokchai K. 2005. Purification and Characterization of Keratinase from A Thermotolerant Feather Degrading Bacterium. *World Journal Microbiol Biotechnology*. 21:1111-1117.
- Sumarsono, T. 2011. *Biodegradasi Camouran Benzen, Toluene dan Xilen (Btx) dalam Adsorben Clay oleh konsorsium Mikroba dengan Penamabahan Biosurfaktan Pseudomonas putida TI (8)*. Departemen Biologi. Universitas Airlangga.
- Ugoh, Sylvanus, C., and Ijigbade, B. 2013. Production and Characterization of Keratinase By Fungi Isolated From Soil Samples At Gwagwalada, FCT- Abuja, Nigeria . *Nature and Science*. (11).10.
- Werlang, P. O., and Brandelli, A. 2005. Characterization of a novel feather-degrading *Bacillus sp.* strain. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology*. 120(1). 71–79.
- Willey, J. M., Sherwood, L. M., and Woolferton, C. J. 2008. Prescott, Harley, and Klein's. *Microbiology, Seventh Edition*. The McGraw-Hill Companies, Inc. New York.
- Xu, B., Zhong, Q., Tang, X., Yang, Y., and Huang, Z. 2009. Isolation and characterization of a new keratinolytic bacterium that exhibits significant feather-degrading capability. *African Journal of Biotechnology*. 8(18), 4590–4596.
- Yue XY., Zhang B., Jiang DD., Liu YJ., and Niu GT. 2011. Characterization of a New Feather Degrading Bacterium from *Calotes versicolor* Feces. *African Journal of Biotechnology*. 12: 5-7.
- Zerdani, I., Faid, M., and Malki, A. 2004. Feather wastes digestion by new isolated strains *Bacillus sp.* in Morocco. *African Journal of Biotechnology*. 3(1), 67–70