

PENGARUH PENAMBAHAN ION LOGAM DIVALEN (Fe^{2+} , Cu^{2+} , DAN Zn^{2+}) TERHADAP PRODUKSI HIDROLISAT PROTEIN DARI LIMBAH BULU AYAM OLEH BAKTERI ISOLAT B-9-6

(Skripsi)

Oleh

**GITA FITRIA
NPM 2017011068**



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2025**

ABSTRAK

PENGARUH PENAMBAHAN ION LOGAM DIVALEN (Fe^{2+} , Cu^{2+} , DAN Zn^{2+}) TERHADAP PRODUKSI HIDROLISAT PROTEIN DARI LIMBAH BULU AYAM OLEH BAKTERI ISOLAT B-9-6

Oleh

Gita Fitria

Bulu ayam merupakan limbah dari rumah potong ayam (RPA) yang mengandung 80-90% protein berupa keratin. Protein keratin pada bulu ayam sulit terdegradasi secara alami. Protein keratin dapat didegradasi oleh enzim keratinase menghasilkan hidrolisat protein yang dapat dimanfaatkan lebih lanjut. Penambahan ion logam divalen secara umum dapat meningkatkan produksi dan aktivitas keratinase dengan berperan sebagai kofaktor, namun pada konsentrasi tertentu ion logam divalen juga dapat berperan sebagai inhibitor enzim keratinase. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan ion logam divalen Fe^{2+} , Cu^{2+} , dan Zn^{2+} terhadap produksi hidrolisat protein oleh bakteri isolat B-9-6. Parameter yang dianalisis meliputi pertumbuhan bakteri, persen degradasi bulu ayam, kadar hidrolisat protein, kadar asam amino yang dibebaskan, dan aktivitas enzim keratinase. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan ketiga jenis ion logam divalen dengan konsentrasi 1 mM menghambat proses degradasi dan secara umum menurunkan kemampuan produksi hidrolisat protein dari bulu ayam. Persen degradasi yang diperoleh pada kultur tanpa penambahan ion logam yaitu sebesar 56,56%, sedangkan dengan penambahan ketiga ion logam tersebut diperoleh secara berturut-turut nilai sebesar: 33,43%; 28,59%; dan 26,4%. Pertumbuhan bakteri tertinggi diperoleh pada kondisi kultur dengan penambahan ion logam Fe^{2+} yaitu sebesar 2,065. Kadar hidrolisat protein tertinggi diperoleh pada kondisi kultur tanpa penambahan ion logam yaitu sebesar 1.497,14 ppm. Kadar asam amino tertinggi diperoleh pada kondisi kultur tanpa penambahan ion logam yaitu sebesar 1.096,15 ppm. Nilai aktivitas enzim tertinggi terdapat pada kultur dengan penambahan ion logam Fe^{2+} yaitu sebesar 19,35 U/mL.

Kata kunci: Bulu ayam, biodegradasi, hidrolisat protein, isolat bakteri B-9-6, dan ion logam divalen.

ABSTRACT

EFFECT OF ADDING DIVALENT METAL IONS (Fe^{2+} , Cu^{2+} , AND Zn^{2+}) ON PROTEIN HYDROLYSATE PRODUCTION FROM CHICKEN FEATHER WASTE BY BACTERIAL ISOLATE B-9-6

By

Gita Fitria

Chicken feathers are waste from chicken slaughterhouses that contain 80-90% protein in the form of keratin. Keratin protein in chicken feathers is difficult to degrade naturally. Keratin protein can be degraded by keratinase enzymes to produce protein hydrolysates that can be utilized further. The addition of divalent metal ions can generally increase the production and activity of keratinase by acting as a cofactor, but at certain concentrations divalent metal ions can also act as inhibitors of keratinase enzymes. This study aims to determine the effect of the addition of divalent metal ions Fe^{2+} , Cu^{2+} , and Zn^{2+} on the production of protein hydrolysates by bacterial isolate B-9-6. Parameters analyzed included bacterial growth, percent degradation of chicken feathers, protein hydrolysate content, liberated amino acid content, and keratinase enzyme activity. The results showed that the addition of all three types of divalent metal ions at a concentration of 1 mM inhibited the degradation process and generally decreased the ability to produce protein hydrolysates from chicken feathers. Percent degradation obtained in cultures without the addition of metal ions is 56.56%, while with the addition of the three metal ions obtained consecutively values of: 33.43%; 28.59%; and 26.4%. The highest bacterial growth was obtained in culture conditions with the addition of Fe^{2+} metal ions, which amounted to 2.065. The highest protein hydrolysate content was obtained in culture conditions without the addition of metal ions, which amounted to 1,497.14 ppm. The highest amino acid content was obtained in culture conditions without the addition of metal ions, which amounted to 1,096.15 ppm. The highest enzyme activity value was found in the culture with the addition of Fe^{2+} metal ions, which amounted to 19.35 U/mL.

Keywords: Chicken feathers, biodegradation, protein hydrolysate, bacterial isolate B-9-6, and divalent metal ions.

PENGARUH PENAMBAHAN ION LOGAM DIVALEN (Fe^{2+} , Cu^{2+} , DAN Zn^{2+}) TERHADAP PRODUKSI HIDROLISAT PROTEIN DARI LIMBAH BULU AYAM OLEH BAKTERI ISOLAT B-9-6

Oleh

Gita Fitria

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
2025**

Judul Penelitian : **Pengaruh Penambahan Ion Logam Divalen (Fe^{2+} , Cu^{2+} , dan Zn^{2+}) terhadap Produksi Hidrolisat Protein dari Limbah Bulu Ayam oleh Bakteri Isolat B-9-6**

Nama Mahasiswa : **Gita Fitria**

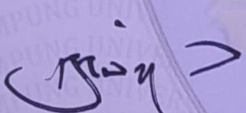
Nomor Pokok Mahasiswa : **2017011068**

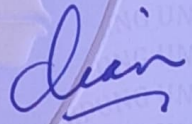
Jurusan : **Kimia**

Fakultas : **Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**

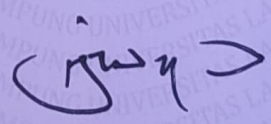
MENYETUJUI

1. Komisi Pembimbing


Mulyono, S.Si., M.Si., Ph.D.
NIP. 197406112000031002


Dr. Dian Herasari, S.Si., M.Si.
NIP. 197108062000032001

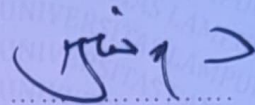
**2. Wakil Dekan Bidang Akademik dan Kerja sama
FMIPA Universitas Lampung**


Mulyono, S.Si., M.Si., Ph.D.
NIP. 197406112000031002

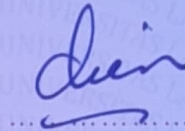
MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

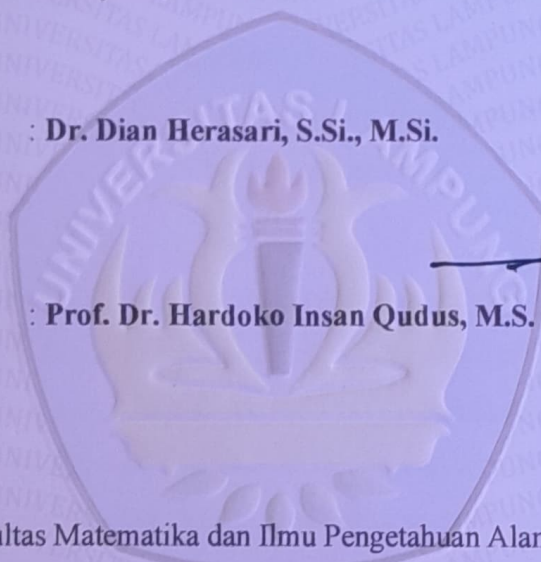
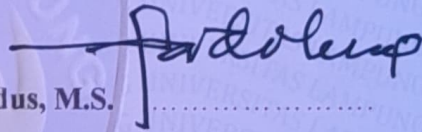
Ketua : **Mulyono, Ph.D.**



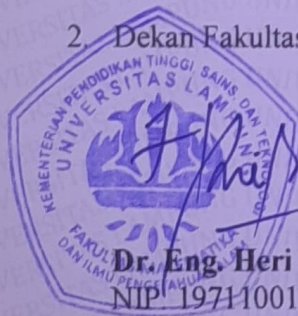
Sekretaris : **Dr. Dian Herasari, S.Si., M.Si.**



Anggota : **Prof. Dr. Hardoko Insan Qudus, M.S.**



2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si.

NIP. 197110012005011002

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : **17 Juni 2025**

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Gita Fitria
Nomor Pokok Mahasiswa : 2017011068
Jurusan : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa skripsi yang berjudul **“Pengaruh Penambahan Ion Logam Divalen (Fe^{2+} , Cu^{2+} , dan Zn^{2+}) terhadap Produksi Hidrolisat Protein dari Limbah Bulu Ayam oleh Bakteri Isolat B-9-6”** adalah benar karya saya sendiri, baik gagasan, hasil, maupun analisisnya. Selanjutnya saya tidak keberatan apabila sebagian atau seluruh data di dalam skripsi ini digunakan oleh dosen atau program studi untuk kepentingan publikasi sesuai dengan kesepakatan.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sadar dan sebenar-benarnya untuk digunakan sebagai mestinya.

Bandar Lampung, 26 Juni 2025

Yang menyatakan



Gita Fitria

NPM. 2017011068

RIWAYAT HIDUP



Penulis bernama lengkap Gita Fitria, lahir di OKU Timur Prov. Sumatera Selatan pada 07 Desember 2002. Penulis merupakan anak kedua dari tiga bersaudara. Putri dari pasangan Bapak Saripudin dan Ibu Nursiah.

Penulis menyelesaikan pendidikan dasar di SD Negeri Sukaraja pada tahun 2014, kemudian melanjutkan pendidikan di SMP Negeri 1 Buay Madang dan lulus pada tahun 2017. Pendidikan menengah atas ditempuh di SMA Negeri 1 Buay Madang dan lulus pada tahun 2020. Pada tahun yang sama, penulis diterima sebagai mahasiswa Jurusan Kimia di Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung melalui jalur Seleksi Bersama Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SBMPTN).

Selama masa perkuliahan penulis pernah menjadi asisten praktikum Biokimia untuk mahasiswa pendidikan kimia dan Biologi pada tahun ajaran 2023/2024. Selain itu penulis aktif dalam kegiatan organisasi. Organisasi yang pernah penulis ikuti adalah Himpunan Mahasiswa Kimia (Himaki) FMIPA Unila mulai sebagai kader muda pada tahun 2020, anggota bidang Sains dan Penalaran Ilmu Kimia (SPIK) Himaki FMIPA Unila periode 2021 dan 2022, anggota Biro Dana dan Usaha ROIS FMIPA Unila periode 2021, dan sekretaris Komisi 1 Legislasi DPM FMIPA Unila periode 2023. Penulis melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) di desa Sukamandi, Kec. Way Lima, Pesawaran pada tahun 2023. Pada tahun 2024, penulis melaksanakan Praktik Kerja Lapangan (PKL) dan Penelitian di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia FMIPA Unila. Pada tahun 2025 penulis berhasil menyelesaikan Tugas Akhir dengan judul “Pengaruh Penambahan Ion Logam Divalen (Fe^{2+} , Cu^{2+} , dan Zn^{2+}) terhadap Produksi Hidrolisat Protein dari

Limbah Bulu Ayam oleh Bakteri Isolat B-9-6“ di Laboratorium Biokimia Jurusan
Kimia FMIPA Unila.

MOTTO

“Never give up – no metter what life throws at you, never give up”

(Penulis)

“Karena sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan. Sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan”

(Q.S. Al-Insyirah: 5-6)

“Boleh jadi kamu membenci sesuatu, padahal itu baik bagimu. Dan boleh jadi kamu menyukai sesuatu, padahal itu buruk bagimu. Allah mengetahui, sedangkan kamu tidak mengetahui”

(Q.S. Al-Baqarah: 216)

“Allah tidak membebani seseorang melainkan sesuai dengan kemampuannya...”

(Q.S. Al-Baqarah: 286)

*“Just gotta hold on, yeah I know that it hurts, but the sun will shine through.
There’s gon’ be better days - ‘Cause no storm lasts forever (Ain’t that a truth)”*

(SuperM – Better Days)

PERSEMBAHAN



Dengan mengucap *alhamdulillah robbil 'alamin* atas ridho Allah SWT dengan segala rasa syukur kupersembahkan karya sederhana ini kepada:

Kedua orang tuaku tercinta (Bapak Saripudin dan Ibu Nursiah)

Yang telah mendidik, menemani, menyemangati, dan mendo'akan penulis.
Terima kasih atas restu yang tiada henti dalam setiap langkah penulis hingga sekarang dan sampai nanti.

Kakak dan Adikku Tersayang

Terima kasih atas segala dukungan dan semangatnya selama ini kepada penulis

Dengan rasa hormat kepada :

Bapak Mulyono, Ph.D.
Ibu Dr. Dian Herasari, S.Si., M.Si.
Bapak Prof. Dr. Hardoko Insan Qudus, M.S.

Terima kasih atas bimbingan, ilmu, nasihat, dan kesabaran dalam membimbing penulis selama ini.

Bapak Ibu Dosen Jurusan Kimia FMIPA Unila

Terima kasih atas ilmu yang telah diberikan selama penulis menempuh pendidikan di kampus.

Universitas Lampung

Almamater Tercinta

SANWACANA

Puji syukur senantiasa penulis panjatkan kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan karunia yang diberikan sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Pengaruh Penambahan Ion Logam Divalen (Fe^{2+} , Cu^{2+} , dan Zn^{2+}) terhadap Produksi Hidrolisat Protein dari Limbah Bulu Ayam oleh Bakteri Isolat B-9-6”**. Sholawat serta salam selalu tercurah kepada junjungan kita Nabi Muhammad SAW, beserta keluarga dan para sahabatnya.

Skripsi ini dapat terselesaikan tidak lepas dari bimbingan dan bantuan dari berbagai pihak. Dengan kerendahan diri dan ketulusan hati, penulis mengucapkan terima kasih kepada :

1. Bapak Mulyono, Ph.D., selaku Dosen Pembimbing I yang telah banyak memberikan ilmu pengetahuan, bimbingan, gagasan, bantuan, semangat, dan saran kepada penulis dalam pelaksanaan penelitian serta penulisan skripsi ini. Bersedia melungakan waktu ditengah kesibukan yang padat membimbing mahasiswanya dengan sabar dan ikhlas.
2. Ibu Dr. Dian Herasari, S.Si., M.Si., selaku Dosen Pembimbing II, atas semua saran, masukan, dan ilmu pengetahuan yang diberikan selama proses perkuliahan dari awal sampai penyelesaian skripsi ini
3. Bapak Prof. Dr. Hardoko Insan Qudus, M.S., selaku Dosen Pembahas yang telah memberikan kritik, saran, arahan, dan ilmu pengetahuan kepada penulis sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik.
4. Bapak Dr. Sonny Widiarto, S.Si., M.Sc., selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah memberikan banyak ilmu pengetahuan dan motivasi selama penulis menjalankan pendidikan di kampus.
5. Ibu Dr. Mita Rilyanti, S.Si., M.Si., selaku ketua jurusan kimia FMIPA Universitas Lampung.

6. Bapak dan Ibu Dosen serta staff Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung atas semua bantuan, ilmu pengetahuan dan motivasi yang diberikan kepada penulis selama penulis menjalankan pendidikan.
7. Bapak Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si., selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu pengetahuan Alam Universitas Lampung.
8. Orang tua penulis, Ayah dan Ibu tercinta (Bapak Saripudin dan Ibu Nursiah) yang selalu mendo'akan setiap langkah penulis.
9. Kakak penulis, Intan Wandira, S.Si., M.Si., Gr., atas segala bantuan, nasihat, dan motivasinya selama penulis menjalankan pendidikan.
10. Adik penulis Faqih Aji Surya dan dua keponakan penulis (Naira dan Naura), atas keceriaan yang menghibur penulis selama penulis menjalankan penelitian dan menyusun skripsi.
11. Mba Della selaku PLP Laboratorium Biokimia yang memfasilitasi selama penulis melakukan penelitian.
12. Teman-teman seperjuanganku, Mulyono Research 2020, Ribka Angelina Gultom, S.Si., Ratih Nurhidayati, S.Si., Hamida, S.Si., dan Sabrina Zulaika, S.Si., yang telah berjuang bersama menyelesaikan pendidikan ini.
13. Sahabat-sahabatku, Sabrina, Hamida, Alda, Agil, Ida, Eva, Ester dan Fathia.
14. Kak Alinil Masruroh, S.Si., dan kak Virginia Nuh Reza Amanda, S.Si., atas bimbingan, motivasi, dan semangat kepada penulis selama penulis melakukan penelitian.
15. Keluarga laboratorium biokimia, agil, umi, kak ejak, kak nindy, Biokimia'20, dan Biokimia'21
16. Kakak-kakak Tim Riset Mulyono, kak Alinil, Kak Dira, Kak Dita dan Kak Natasya yang banyak membantu penulis memberikan saran untuk penelitian dan skripsi. Dan untuk adik-adik Tim Mulyono Riset 2021 tetap semangat dalam penelitiannya.
17. Teman-teman kimia angkatan 2020 tanpa terkecuali.
18. Teman-teman KKN desa Sukamandi terutama Nyayu Syarifa Kurnia Putri dan Akbar Hidayat, S.T., yang membantu penulis mencari bahan untuk penelitian bahkan sampai mengelilingi bandar lampung, terima kasih banyak.
19. Almamater tercinta, Universitas Lampung.

20. Serta seluruh pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu yang telah banyak membantu dan mendo'akan baik secara langsung maupun tidak langsung selama penulis menyelesaikan studinya.

Semoga segala bantuan dan dukungan yang diberikan mendapat balasan pahala dari Allah SWT. Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih terdapat beberapa ketidaksempurnaan, namun penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi pembaca. Aamiin.

Bandar Lampung, Juni 2025

Gita Fitria

DAFTAR ISI

DAFTAR ISI.....	xv
DAFTAR TABEL	xvii
DAFTAR GAMBAR.....	xviii
I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Tujuan Penelitian.....	4
1.3. Manfaat Penelitian	4
II. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1. Bulu Ayam.....	5
2.2. Limbah Bulu Ayam	6
2.3 Keratin	7
2.4. Mikroba Keratinolik	9
2.5. Enzim Keratinase.....	10
2.6 Biodegradasi	11
2.7. Aktivitas Enzim	12
2.8. Uji Kadar Hidrolisat Protein	13
2.9. Ion Logam Sebagai Kofaktor Enzim	14
2.10. Spektrofotometri UV-VIS.....	15
III.METODE PENELITIAN	18
3.1. Waktu dan Tempat Penelitian.....	18
3.2. Alat dan bahan	18
3.3. Prosedur Penelitian	19
3.3.1. Tahap Persiapan.....	19
3.3.2. Peremajaan Bakteri.....	20

3.3.3. Pembuatan Inokulum (<i>Starter</i>) Mikroba.....	20
3.3.4. Uji Biodegradasi Limbah Bulu Ayam	21
3.3.5. Pengukuran Pertumbuhan Bakteri	21
3.3.6. Pengukuran Kadar Asam Amino yang dibebaskan	22
3.3.7. Uji Aktivitas Enzim Keratinase	22
3.3.8. Penentuan Kadar Protein	23
3.4. Skema Penelitian.....	24
IV.HASIL DAN PEMBAHASAN.....	25
4.1. Hasil Sampel Bulu Ayam	25
4.2. Hasil Peremajaan Isolat B-9-6.....	25
4.3. Inokulum Isolat B-9-6.....	26
4.4. Pengaruh Penambahan Ion logam Divalen terhadap Biodegradasi Limbah Bulu Ayam.....	27
4.5. Pengaruh Penambahan Ion logam Divalen terhadap Pertumbuhan Bakteri Keratinolik	30
4.6. Pengaruh Penambahan Ion logam Divalen terhadap Kadar Asam Amino	32
4.7. Pengaruh Penambahan Ion logam Divalen terhadap Aktivitas Enzim Keratinase	34
4.8. Pengaruh Penambahan Ion logam Divalen terhadap Kadar Hidrolisat Protein ...	36
V. SIMPULAN DAN SARAN	39
5.1. Kesimpulan	39
5.2. Saran	40
DAFTAR PUSTAKA	41
LAMPIRAN.....	49

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Komposisi asam amino keratin bulu ayam	7
2. Hasil kemampuan degradasi limbah bulu ayam oleh isolat B-9-6.....	28
3. Perbandingan hasil biodegradasi limbah bulu ayam pada beberapa penelitian	29
4. Nilai pengukuran OD pada fermentasi hari ke-12 oleh isolat bakteri B-9-6	30
5. Kadar asam amino pada fermentasi hari ke-12 oleh isolat bakteri B-9-6	33
6. Aktivitas enzim keratinase pada fermentasi hari ke-12 oleh isolat B-9-6.....	34
7. Kadar protein hasil fermentasi selama 12 hari oleh isolat bakteri B-9-6.....	37
8. Data perhitungan persen degradasi isolat B-9-6 dengan berbagai kondisi kultur.....	50
9. Nilai absorbansi tirosin pada berbagai konsentrasi, diukur pada panjang gelombang 280 nm.	51
10. Perhitungan nilai OD hasil fermentasi selama 12 hari oleh isolat bakteri B-9-6.....	52
11. Data perhitungan kadar asam amino pada berbagai media fermentasi selama 12 hari oleh isolat bakteri B-9-6	52
12. Data perhitungan aktivitas enzim keratinase.....	53
13. Nilai absorbansi BSA pada berbagai konsentrasi	54
14. Data perhitungan kadar protein pada berbagai jenis kultur dari fermentasi selama 12 hari oleh isolat B-9-6	55

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Anatomi Bulu Ayam (Tesfaya <i>et al.</i> , 2017).....	5
2. Struktur Molekul Protein (Srivastava <i>et al.</i> , 2020)	8
3. Spektrum cahaya tampak (Rafi <i>et al.</i> , 2021).....	16
4. Skema alur penelitian.....	24
5. Bulu ayam	25
6. Hasil peremajaan bakteri B-9-6	26
7. Inokulum isolat B-9-6 (a) kontrol, (b) inokulum	27
8. Diagram batang persen degradasi hasil fermentasi selama 12 hari oleh isolat B-9-6...	28
9. Diagram batang OD dari fermentasi bulu ayam oleh isolat B-9-6 selama 12 hari	31
10. Kadar asam amino hasil fermentasi selama 12 hari oleh isolat B-9-6.	33
11. Diagram batang aktivitas enzim keratinase hasil fermentasi selama 12 hari oleh isolat B-9-6.....	35
12. Diagram batang kadar protein hasil fermentasi selama 12 hari oleh isolat B-9-6	37
13. Kurva standar tirosin.....	51
14. Kurva standar BSA	54
15. Kondisi kultur setelah fermentasi selama 12 hari (a) tanpa penambahan ion logam, (b) ion logam Fe^{2+} , (c) ion logam Cu^{2+} , dan (d) ion logam Zn^{2+}	55
16. Berat kering setelah kertas saring dikeringkan dalam oven selama 24 jam (a) kontrol, (b) tanpa penambahan ion logam, (c) ion logam Fe^{2+} , (d) ion logam Cu^{2+} , dan (e) ion logam Zn^{2+}	56

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Peningkatan permintaan konsumen terhadap daging ayam mengakibatkan banyaknya industri peternakan ayam dan menghasilkan jumlah limbah bulu ayam yang tinggi. Berdasarkan data Badan Pusat Statistik (BPS), pada tahun 2024 produksi daging ayam di Indonesia mencapai 3.835.917 ton, dari jumlah tersebut, Provinsi Lampung menyumbangkan jumlah produksi daging ayam sebesar 105.871,31 ton, dan menjadi urutan ke-8 produksi daging ayam terbesar di Indonesia. Menurut Sa'adah *et al.* (2013) untuk bobot ayam 1,6 kg, 4-5% nya adalah bulu ayam. Bulu ayam akan mencemari lingkungan jika dibuang begitu saja karena merupakan limbah yang sulit didegradasi. Pemanfaatan limbah bulu ayam pada saat ini hanya sebatas pada pembuatan kerajinan tangan (Sari dkk, 2015). Bulu ayam mempunyai potensi untuk dimanfaatkan lebih lanjut karena kandungan proteinnya yang tinggi yaitu sebesar 80-91% melebihi kandungan protein kasar bungkil kedelai (42,5%) dan tepung ikan (66,2%) (Gultom dkk, 2017).

Limbah bulu ayam memiliki kandungan 91% keratin, 1% lemak, dan 8% air (Saravanan and Dhurai, 2012). Keratin merupakan produk pengerasan jaringan epidermal tubuh seperti kuku, rambut, dan bulu yang tersusun atas protein serat (fibrous) yang kaya akan sistein dan sistin (Sinoy *et al.*, 2011). Keratin yang terdapat pada bulu ayam memiliki sifat yang sulit untuk terdegradasi karena memiliki stabilitas ikatan yang tinggi dan sulit untuk larut dalam air (Mastuti, 2022). Keratin memiliki ikatan disulfida yang terbentuk antara dua atom sulfur dari dua gugus tiol (-SH), biasanya dari asam amino sistein. 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 seperti tripsin, pepsin, dan papain yang terdapat dalam organ pencernaan (Marzuki, 2015). Keratin dapat didegradasi oleh enzim protease khusus, salah satunya yaitu enzim keratinase.

Enzim keratinase menghidrolisis keratin dengan memecahkan ikatan disulfida, sehingga keratin akan terpecah menjadi protein sederhana atau bahkan asam amino (wahyuni dkk, 2023), yaitu serin, sistein, dan prolin.. Selain asam amino, pemecahan keratin juga menghasilkan peptida (Saramousavi *et al.*, 2013). Keratinase mempunyai kemampuan yang sangat baik dalam menurunkan kadar keratin melalui perombakan struktur jaringan kimia dinding sel, pemutusan ikatan hidrogen dan ikatan disulfida penyusun keratin (Rodriguez *et al.*, 2009). Asam amino hasil degradasi keratin dari bulu ayam mempunyai banyak manfaat, seperti *edible film* untuk kemasan layak makan (Mirdayanti dan Amalia, 2020), pakan ikan (Mulia dkk, 2022), campuran bahan pupuk (Inonu dkk, 2016), campuran bahan pakan unggas (Da Silva, 2018), dan lain sebagainya.

Enzim keratinase dihasilkan oleh mikroorganisme seperti *Microbacterium sp.* (Riffel and Brandelli, 2006), *Streptomyces* dan beberapa genus Actinomycetes (Cai *et al.*, 2008), *Bacillus licheniformis* (Tamilmani *et al.*, 2008), *Burkholderia*, *Chryseobacterium*, *Pseudomonas*, *Microsporum* (Essien *et al.*, 2009) dan *Bacillus* (Jeevana *et al.*, 2013), *Bacillus subtilis*, *Actinomyces* dari genus *Streptomyces* dan *Aspergillus* (Balakrishnan and Padmanabhan, 2019).

Anggraini (2018) telah melakukan isolasi dan karakterisasi mikroorganisme pendegradasi limbah bulu ayam. Hasil yang diperoleh, yaitu terdapat 2 isolat yang memiliki aktivitas keratinolitik tertinggi yaitu isolat B-9-6 yang memiliki persen degradasi sebesar 65% dan B-9-7 sebesar 66%.

Aktivitas enzim dapat dipengaruhi oleh keberadaan kofaktor, yaitu senyawa non-protein yang dibutuhkan enzim untuk menjalankan fungsinya secara optimal. Kofaktor dapat berupa senyawa organik (koenzim) maupun ion logam. Dalam konteks keratinase, ion logam divalen seperti Fe^{2+} , Cu^{2+} , dan Zn^{2+} telah dilaporkan sebagai kofaktor yang dapat meningkatkan stabilitas struktur enzim dan aktivitas katalistiknya. Dong *et al.* (2017) melaporkan bahwa penambahan

Fe^{2+} meningkatkan aktivitas keratinase yang diproduksi oleh *Bacillus polyfermenticus* B4. Zhang *et al.* (2022) juga melaporkan ion logam Mg^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , dan Mn^{2+} meningkatkan aktivitas keratinase yang diproduksi oleh *Bacillus cereus* YQ15 pada konsentrasi 10 mM. Tidak semua ion logam divalen memberikan efek positif, beberapa ion logam seperti Cu^{2+} memiliki efek penghambatan terhadap aktivitas keratinase. Imtiaz dan Rehman (2018) melaporkan ion Cu^{2+} memiliki efek penghambatan terhadap aktivitas keratinase yang diproduksi oleh *Bacillus subtilis* BML5 pada konsentrasi 10 mM. Dalam beberapa literatur ilmiah menyatakan penggunaan ion Fe^{2+} sebagai kofaktor enzimatik sebaiknya dibatasi hingga konsentrasi maksimal sekitar 1 mM. hal ini karena konsentrasi yang lebih tinggi menyebabkan penurunan aktivitas bahkan inaktivitas enzim. Sebagai contoh, dalam studi mengenai laccase dari *Methylobacterium extorquens*, Fe^{2+} dapat meningkatkan aktivitas enzim pada konsentrasi rendah, ketika konsentrasi melebihi 1 mM efek aktivitas tidak lagi meningkat (Ainiwaer *et al.*, 2022).

Penambahan ion logam divalen tidak hanya berpengaruh pada aktivitas enzim, tetapi juga berdampak pada degradasi substrat. Azizah dan Suharti (2024), melaporkan efek penambahan ion logam divalen dengan konsentrasi 1mM pada 3 jenis bakteri yaitu, *Bacillus* sp. MD24, *Salinivibrio proteolyticus* DV TG6, dan konsorsium menggunakan metode LSF, diperoleh persen degradasi tertinggi yaitu *Bacillus* sp. MD24 (41,6% Ca^{2+}); *Salinivibrio proteolyticus* DV TG6 (30,4% Cu^{2+}); dan konsorsium (22,6% Fe^{2+}).

Masruroh (2024) membandingkan metode *Liquid State Fermentation* (LSF) dan *Solid State Fermentation* (SSF) untuk degradasi bulu ayam menggunakan isolat B-9-6, dan diperoleh metode LSF lebih baik dari SSF dengan persen degradasi sebesar 69,71%. Bila dibandingkan hasil persen degradasi yang didapatkan oleh Masruroh (2024), kondisi kultur tanpa penambahan ion logam divalen dengan hasil persen degradasi yang diperoleh oleh Azizah dan Suharti (2024) kondisi kultur penambahan beberapa ion logam divalen. Ion logam memberikan efek menurunkan persen degradasi bulu ayam. Hingga saat ini, pengaruh penambahan ion logam pada kultur isolat B-9-6 belum diuji.

Berdasarkan uraian di atas, maka pada penelitian ini dilakukan uji pengaruh penambahan ion logam divalen terhadap produksi hidrolisat protein dari limbah bulu ayam oleh bakteri isolat B-9-6 menggunakan metode LSF.

1.2. Tujuan Penelitian

Tujuan dilakukannya penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. mengetahui pengaruh penambahan ion logam divalen terhadap kemampuan isolat B-9-6 dalam mendegradasi limbah bulu ayam
2. mengetahui kadar asam amino dari hasil biodegradasi limbah bulu ayam
3. mengetahui kadar protein dari hasil biodegradasi limbah bulu ayam
4. mengetahui pengaruh penambahan ion logam divalen terhadap aktivitas enzim pada kultur biodegradasi limbah bulu ayam

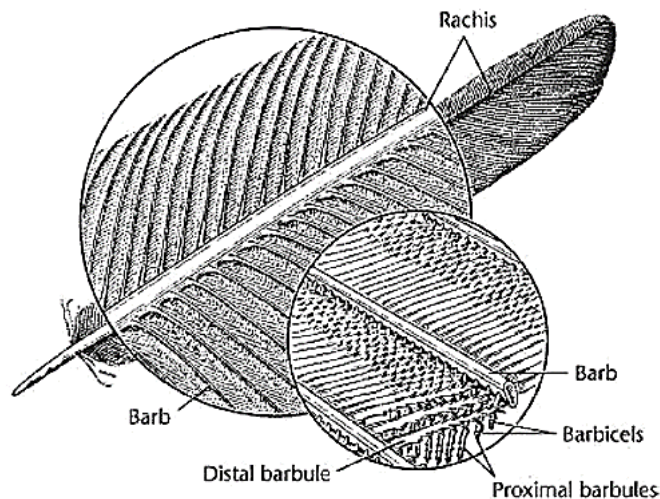
1.3. Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah memberikan informasi pengaruh penambahan ion logam divalen terhadap kemampuan bakteri isolat B-9-6 dalam kemampuannya mendegradasi struktur keratin dalam limbah bulu ayam dalam upaya mengurangi dan memanfaatkan limbah bulu ayam yang terdapat pada lingkungan pemotongan ayam.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Bulu Ayam

Bulu ayam merupakan bagian dari tubuh ayam yang berada paling luar. Bulu merupakan salah satu ciri khusus yang dimiliki oleh unggas seperti ayam. Bulu memiliki peranan yang penting dalam proses fisiologi. Bulu difungsikan sebagai pemberi kemampuan dalam hal penerbangan dan sebagai perlindungan, bulu pada ayam berfungsi untuk memperindah bentuk tubuh ayam dan sangat diperlukan untuk fungsi pengaturan suhu tubuh. Bulu tersusun sangat teratur, dengan struktur tangga bercabang. Unggas merupakan golongan vertebrata yang memiliki struktur keratin yang paling kompleks (Rostyalina, 2015). Anatomi dari bulu ayam dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Anatomi Bulu Ayam (Tesfaya *et al.*, 2017)

Bulu ayam mengandung protein kasar, lemak kasar, dan serat kasar. Protein bulu ayam sebagian besar terdiri atas keratin yang digolongkan ke dalam protein serat. Protein serat ini kaya akan sulfur dan sistein. Sistein merupakan asam amino yang mengandung gugus fungsional berupa karboksilat, amina, dan sulfhidril (Nor *et al.*, 2014). Kandungan bulu ayam terdiri dari 91% protein keratin, 1% lipid dan 8% air. Keratin pada bulu ayam sebagian besar disusun oleh asam amino sistein, glutamin, prolin, serin glisin, alanin, dan valin, serta sedikit lisin, metionin dan triptofan (Saravanan and Dhurai, 2012). Bulu ayam memiliki kandungan protein keratin dengan struktur α -helik, selain bulu ayam material lain seperti rambut, wol, sayap, kuku, cakar, duri, sisik, tanduk, kulit penyu, dan lapisan kulit sebelah luar kaya akan protein α -keratin (Lehninger, 2005).

2.2. Limbah Bulu Ayam

Bulu ayam merupakan limbah yang berasal dari rumah potong ayam (RPA) dengan jumlah berlimpah dan terus bertambah seiring meningkatnya populasi ayam dan tingkat pemotongan sebagai akibat meningkatnya permintaan daging ayam oleh konsumen. Peningkatan jutaan ton limbah bulu ayam yang dihasilkan dan setiap tahunnya meningkat, menimbulkan beberapa masalah lingkungan yaitu pencemaran lingkungan, dikarenakan kandungan protein yang sangat tinggi didalamnya (Mastuti, 2022).

Upaya yang ada saat ini dalam menangani masalah limbah bulu ayam hanya berupa pembuangan langsung ke lingkungan, pemendaman *landfilling* atau pembakaran yang menyebabkan timbulnya masalah baru yaitu harus adanya pengontrolan emisi dan pembuangan abu, jika dibiarkan dan terus bertambah seiring berjalannya waktu tanpa ada pengelolaan yang baik, dipastikan akan mengakibatkan dampak pencemaran lingkungan yang semakin luas (Joshi *et al.*, 2007). Protein yang terkandung di dalam bulu ayam yang terbesar yaitu keratin, digolongkan ke dalam protein serat yang mempunyai ciri kaya akan asam amino bersulfur yaitu sistein. Pada bulu ayam terdapat lebih dari 90% protein (β -keratin). Struktur β -Heliks cenderung agregat oleh ikatan hidrogen untuk membentuk unit

silinder polipeptida struktur rantai yang unik (Setyabudi, 2015). Kandungan asam amino pada protein bulu ayam dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi asam amino keratin bulu ayam

Asam Amino	Konsentrasi (% b/b)
Serin	16,0
Asam glutamat	12,11
Prolin	12,0
Sistien	8,85
Leusin	6,94
Glisin	6,92
Asam aspartat	6,0
Valin	5,93
Arginin	5,57
Fenilalanin	3,94
Isoleusin	3,91
Treonin	3,81
Alanin	3,44
Lisin	2,28
Tirosin	1,10
Histidin	0,95
Metionin	0,57

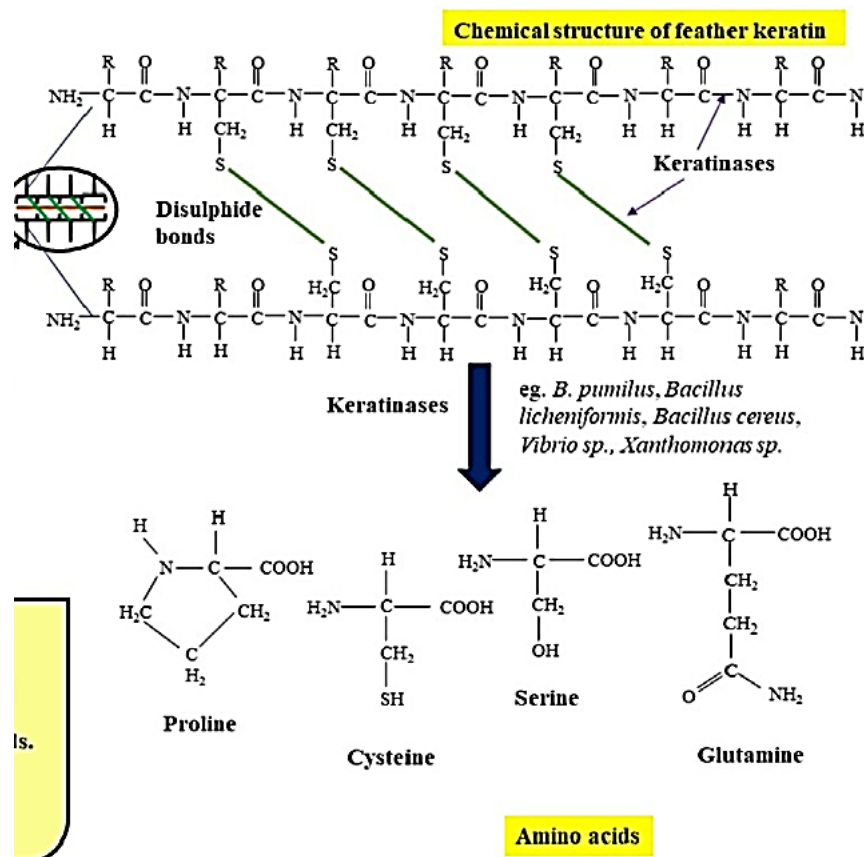
Sumber: Saravanan dan Dhurai (2012)

Potensi kandungan asam amino pada bulu ayam ini dapat digunakan untuk menyediakan 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 merupakan salah satu makromolekul protein yang banyak ditemukan pada rambut, kuku, bulu, tanduk, kulit hewan, dan semua produk epidermis. Keratin merupakan jenis protein yang sulit didegradasi karena dalam struktur penyusunnya terdapat ikatan peptida yang distabilkan oleh ikatan hidrogen,

interaksi hidrofobik, dan beberapa ikatan disulfida (S-S) (Mirdayanti, 2020). Keratin termasuk kedalam jenis 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). Struktur protein ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Struktur Molekul Protein (Srivastava *et al.*, 2020)

Keratin terdiri atas sejumlah asam amino yang sebagian besar adalah sistein, asam glutamat, prolin, serin dan leusin. Asam-asam amino berikatan saling silang membentuk ikatan disulfide dan hydrogen (Larasati, 2015). Berdasarkan struktur sekundernya, keratin dapat diklasifikasikan sebagai α -keratin (α -helix) yang umumnya ditemukan pada rambut, bulu, wol, 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)

2.4. Mikroba Keratinolik

Mikroba keratinolitik merupakan golongan mikroorganisme yang masuk kedalam kelompok mikroorganisme penghasil enzim keratinase. Enzim keratinase diketahui dapat diproduksi dari 3 kelompok mikroorganisme yaitu, bakteri, jamur dan kelompok Actinomycetes.

Dari bakteri yang telah dilaporkan sebagian besar termasuk kedalam bakteri Gram-positif, yaitu misal *Bacillus*, *Lysobacter*, *Nesterionia*, *Kocurica*, dan *Microbacterium*. Beberapa termofil dan ekstremofil yang gram-positif yaitu *Thermoanaerobacter*, *Bacillus*, dan *Nesterionia* juga telah dilaporkan (Friedrich and Antranikian 1996; Rissen and Antranikian 2001; Nam *et al.*, 2002; Gassessse *et al.*, 2003;). Selain itu ada juga bakteri Gram-negatif seperti *Xanthomonas*, *Vibrio*, *Chryseobacterium*, dan *Stenotrophomonas* (Sangali and Brandelli, 2000; De Toni *et al.*, 2002; Yamamura, *et al.*, 2002; Lucas *et al.*, 2003;). Beberapa termofil dan ekstremofil yang gram-negatif yaitu dari genera *Fervidobacterium* (Friedrich and Antranikian 1996; Rissen and Antranikian 2001; Nam *et al.*, 2002; Gassessse *et al.*, 2003).

Kelompok jamur pendegradasi keratin yang paling efektif yaitu, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Trichurus*, *Chrysosporium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Geomyces*, *Doratomyces*, *Curvularia*, *Sepedonium*, *Paecilomyces*, *Gleomastis*, *Myrothecium*, *Monodictys*, *Stachybotrys*, *Scopulariopsis*, dan *Urocladium*. (Gradisar *et al.*, 2000)

Actinomycetes pendegradasi keratin terdapat dalam kelompok *Streptomyces* yaitu, *S. fradiae* (Novel and Nickerson, 1959), *S. pactum* (Bockle *et al.*, 1995), *S. albedo flavus* (Letourneau *et al.*, 1998), *S. thermoviolaceus* SD8 (Chitte *et al.*, 1999), *S. sp. A11* (Mukhopadhyay and Chandra, 1990), *S. dan. graminofaciens* (Szabo *et al.*, 2000), dan kelompok *Thermoactinomyces* yaitu *T. candidus* (Ignatova *et al.*, 1999), dan *Thermoactinomyces sp.* (Gousterova *et al.*, 2005)

2.5. Enzim Keratinase

Enzim keratinase merupakan protease yang berpotensi mendegradasi substrat keratin seperti bulu ayam, rambut, dan wol. Protease dikategorikan menjadi dua kelompok besar. Pertama yaitu endopeptidase, berfungsi memecah ikatan peptida non terminal di dalam rantai polipeptida; dan yang kedua adalah eksoprotease yang memutus ikatan peptida substrat pada terminal amino. Protease juga dapat diklasifikasikan berdasarkan kelompok fungsional situs aktifnya. Empat kelompok yang sering dijumpai adalah protease sistein, protease aspartik, protease serin, dan metalloprotease. Keratinase termasuk kedalam kelompok endopeptidase, keluarga serin protease. Protein keratin kurang mudah dicerna oleh protease lain seperti pepsin, dan tripsin karena rantainya yang kaku dalam struktur α -helix dan β -sheet yang membuatnya stabil secara mekanis sehingga tahan terhadap degradasi mikroba. Sifat dan keunikan degradasi keratin masih menjadi dilema karena sebagian besar keratinase murni yang diketahui selama ini tidak mampu melarutkan keratin asli secara keseluruhan (Gupta and Ramnani, 2006).

Keratinase adalah enzim ekstraselular yang digunakan untuk biodegradasi keratin (Latafat *et al.*, 2021). Keratinase memecahkan ikatan disulfida untuk mendegradasi keratin. keratinase mempunyai kemampuan yang sangat baik dalam menurunkan kadar keratin melalui perombakan struktur jaringan kimia dinding sel, pemutusan ikatan hidrogen dan ikatan disulfida penyusun keratin (Rodriguez *et al.*, 2009). Proses pendegradasi keratin oleh enzim keratinase terjadi melalui 2 tahap utama yaitu proses deaminasi dan pemutusan ikatan disulfida. Pada tahap deaminasi, akan menciptakan kondisi basa yang dibutuhkan untuk membuat struktur keratin mengembang, mengalami sulfitolisis dan berikutnya akan terjadi proses pemutusan ikatan protein keratin (Kunert, 2000). Selanjutnya tahap pemutusan ikatan disulfida, pada tahap ini akan terjadi perubahan struktur yang mampu mempermudah proses pemutusan ikatan antara protein dengan bantuan enzim yang dihasilkan oleh kelompok bakteri proteolitik (Cai *et al.*, 2008). Hasil dari proses pendegredasian itu adalah hidrolisat protein.

Hidrolisat protein merupakan produk yang dihasilkan dari pemecahan protein menjadi peptida sederhana dan asam amino melalui proses hidrolisis dengan menggunakan enzim, asam atau basa dan panas. Proses hidrolisis yang sering digunakan adalah secara enzimatis. Hidrolisis protein dengan menggunakan enzim lebih aman dan menguntungkan daripada menggunakan asam atau basa pada pembuatan *flavor enhancer*. Hidrolisis secara enzimatis akan menghasilkan hidrolisat protein yang terhindar dari kerusakan asam-asam amino, seperti triptofan dan glutamin.

2.6 Biodegradasi

Biodegradasi adalah proses mikroorganisme mendegradasi atau memecah polimer alam (seperti lignin dan selulosa) dan polimer sintetis (seperti polietilen dan polistiren) menjadi molekul yang lebih sederhana (Sriningsih dan Shovitri, 2015). Biodegradasi merupakan reaksi kompleks yang melibatkan oksigen, hidrokarbon, air, garam terlarut, dan pemanfaatan nitrogen untuk pertumbuhan dan reproduksinya melalui berbagai proses oksidasi. Enzim yang dihasilkan oleh mikroba pendegradasi juga berperan untuk mengkatalis reaksi degradasi, sehingga akan membutuhkan waktu yang cukup singkat untuk mencapai keseimbangan (Miranti, 2015).

Pada degradasi keratin, terdapat 2 tahap yang akan dilalui (Rahmawati and Griyanitasari, 2019). Tahap pertama yaitu tahap deaminasi, pada proses ini akan menciptakan suasana basa yang dibutuhkan untuk membuat struktur keratin menjadi mengembang, mengalami sulfitolisis, dan dilanjutkan dengan proses pemutusan ikatan peptida dari protein keratin. Tahap kedua adalah pemutusan ikatan disulfida, pada tahap ini ikatan disulfida akan terputus sehingga akan terjadi perubahan struktur yang mampu mempermudah proses pemutusan ikatan antara protein dengan bantuan enzim dari kelompok bakteri proteolitik (Kunert, 2000).

Keefektifan proses biodegradasi tergantung pada beberapa. Faktor-faktor yang mempengaruhi biodegradasi yaitu :

1. Substrat

Ukuran senyawa penyusun substrat akan mempengaruhi proses degradasi.

Ukuran substrat yang lebih kecil dan senyawa penyusunnya sederhana, akan membuat proses degradasi berlangsung lebih cepat, dan berlaku sebaliknya.

2. Sumber Nitrogen

Nitrogen diperlukan karena berpengaruh terhadap aktivitas mikroba penghasil enzim ekstraseluler. Proses degradasi akan berlangsung cepat jika enzim ekstraseluler yang dihasilkan mikroba banyak.

3. pH

pH menjadi faktor penting dalam proses degradasi karena enzim-enzim tertentu hanya akan mengurai pada substrat sesuai dengan aktivitas pH tertentu. Jika pH sesuai dengan aktivitas enzim, maka kerja enzim ekstraseluler akan optimal. Umumnya mikroba menyukai pH netral atau 7 (Gandjar *et al.*, 2006).

4. Suhu

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, maka 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 antarpartikel) pada matriks padatan, sehingga menghalangi transfer oksigen. Jika jumlah enzim berkurang, maka proses degradasi akan berlangsung lebih lama (Dias *et al.*, 2007).

2.7. Aktivitas Enzim

Aktivitas enzim merupakan ukuran kemampuan suatu enzim dalam mengkatalis suatu reaksi kimia dalam kondisi tertentu. Pada enzim keratinase aktivitasnya

menggambarkan seberapa besar kemampuan enzim dalam mendegradasi substrat keratin menjadi senyawa sederhana seperti peptida dan asam amino bebas.

Metode untuk mengukur aktivitas protease dilakukan dengan menggunakan pengukuran spektrofotometri. Prinsip uji didasarkan pada metode Kambhavi *et al.* (1993) menggunakan kasein sebagai substrat yang dihidrolisis oleh protease menjadi peptida dan asam amino. Laju pembentukan peptida dan asam amino dapat digunakan sebagai tolok ukur untuk aktivitas katalistik protease. Asam amino yang terbentuk harus dipisahkan dari substrat yang tidak terhidrolisis dengan menambahkan TCA. Penambahan TCA juga memiliki fungsi untuk menginaktivkan protease. Menambahkan TCA akan melarutkan produk yang mengandung peptida dan asam amino di TCA, protein yang tidak terhidrolisis akan mengendap. Filtrat yang dipisahkan oleh sedimen dapat diukur pada spektrofotometer pada panjang gelombang 280 nm (Haddar *et al.*, 2009; Kambhavi *et al.*, 1993).

2.8. Uji Kadar Hidrolisat Protein

Hidrolisat protein merupakan produk hasil hidrolisis protein yang dipecah menjadi peptida dan asam amino dengan bantuan asam, basa, atau enzim proteolitik (Puspawati dkk, 2020). Uji kadar hidrolisat protein bertujuan untuk mengetahui sejauh mana proses hidrolisis berlangsung dan untuk mengukur konsentrasi total protein terlarut dalam sampel.

Kadar protein dalam suatu larutan dapat diukur dengan metode Lowry. Metode ini didasarkan pada pengukuran kurva standar BSA (*Bovine Serum Albumin*). kompleks Cu^{2+} dalam lingkungan alkalis akan direduksi menjadi Cu^+ . Ion Cu^+ akan mereduksi reagen Folin-Ciocalteu serta kompleks phosphomolibdat-phosphotungstat, menghasilkan heteropoly-molybdenum blue melalui reaksi oksidasi pada gugus aromatik (rantai samping asam amino) yang dipicu oleh Cu, sehingga menciptakan warna biru yang kuat. Warna ini dapat dideteksi dengan kalorimeter dan menyerap cahaya monokromatis pada panjang gelombang 750

nm. Tingkat intensitas warna yang terbentuk bergantung pada jumlah residu triptofan dan tirosin yang ada (Lowry *et al.*, 1951).

2.9. Ion Logam Sebagai Kofaktor Enzim

Kofaktor merupakan komponen yang diperlukan enzim agar berfungsi secara maksimal. Kofaktor bisa berupa molekul organik kecil (koenzim) atau ion logam anorganik. Ion logam sebagai kofaktor dapat membantu menstabilkan struktur enzim membentuk jembatan antar enzim dan substrat, bahkan bisa ikut serta dalam reaksi kimia (OpenStax, 2020). Enzim tanpa kofaktor disebut apoenzim, sedangkan bentuk aktifnya yang telah berikatan dengan kofaktor disebut holoenzim (Lehninger *et al.*, 2017).

Berdasarkan muatannya, ion logam yang berperan sebagai kofaktor dibedakan menjadi dua, yaitu ion logam divalen dan ion logam monovalen. Jenis ion logam yang digunakan dapat mempengaruhi cara kerja dan kestabilan enzim.

1. Ion Logam Divalen

Ion logam divalen secara umum cenderung meningkatkan produksi dan aktivitas keratinase, seperti contohnya Ca^{2+} , Mg^{2+} , dan Mn^{2+} . Ion-ion ini berperan sebagai kofaktor yang membantu stabilisasi struktur enzim dan meningkatkan efisiensi katalistiknya. Seperti hasil yang telah didapatkan oleh Sharma *et al.* (2022) menunjukkan aktivitas keratinase meningkat secara signifikan oleh Ca^{2+} dan Mg^{2+} dengan peningkatan aktivitas masing-masing sebesar 153,8% dan 211,8%. Zhang *et al.* (2022) juga melaporkan pengaruh ion logam pada aktivitas keratinase menunjukkan ion logam Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} , dan Mg^{2+} memberikan efek stimulasi pada aktivitas keratinase.

Khususnya keberadaan Mn^{2+} pada 10 mM meningkatkan aktivitas enzim lebih dari 1,8 kali lipat. Azizah dan Suharti (2024), melakukan penelitian pengaruh ion logam terhadap produksi keratinase oleh bakteri *Bacillus* sp. MD24, *Salinivibrio proteolyticus* DV TG6, dan konsorsium, hasil penelitian menunjukkan Iom Mn^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} dan Fe^{2+} meningkatkan produksi keratinase pada *Salinivibrio proteolyticus* DV TG6, namun menekan produksi

keratinase oleh *Bacillus* sp. MD24 dan tidak satupun dari ion logam tersebut berpengaruh pada produksi keratinase oleh konsorsium. (Malau dan Sianturi, 2017).

Beberapa ion logam divalen juga dapat menghambat produksi keratinase, seperti yang dilaporkan oleh Nescimento dan Martins (2004), logam Cu^{2+} , Zn^{2+} , dan Hg^{2+} menghambat enzim dan menghilangkan aktivitasnya.

2. Ion Monovalen

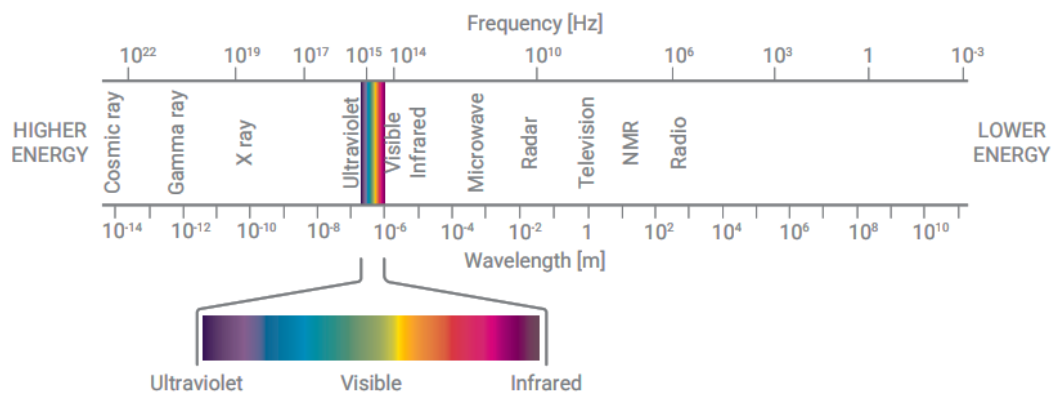
Ion logam monovalen, dalam beberapa kasus dapat bertindak sebagai inhibitor ataupun tidak memberikan efek signifikan, seperti contohnya Li^+ , Na^+ , dan K^+ . Nescimento dan Martins (2004) melaporkan ion logam K^+ menghilangkan aktivitas protease dari 100% menjadi 5%. Sharma *et al.* (2022) melaporkan aktivitas keratinase menurun pada ion logam K^+ mencapai 55,9% dan ion logam Na^+ mencapai 42,9% pada konsentrasi 20 mM.

Namun beberapa studi menyatakan ion logam K^+ dan Na^+ dapat meningkatkan aktivitas keratinase, seperti yang dilaporkan oleh Mamangkey *et al.* (2020) Penambahan Na^+ dan K^+ meningkatkan aktivitas relatif keratinase sebesar 113% dan 112%, masing-masing, dibandingkan kontrol tanpa ion logam

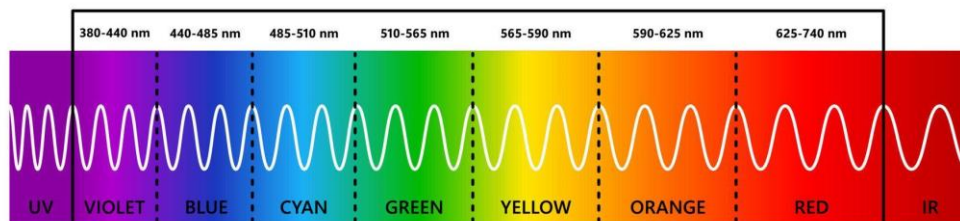
Secara umum ion logam divalen seperti Ca^{2+} , Mg^{2+} , dan Mn^{2+} cenderung meningkatkan produksi dan aktivitas keratinase, sementara ion logam monovalen seperti K^+ dan Na^+ dapat memiliki efek penghambatan. Namun efek ini sangat tergantung pada spesies mikroorganisme, kondisi lingkungan, dan konsentrasi ion logam.

2.10. Spektrofotometri UV-VIS

Spektrofotometri UV-Vis adalah suatu metode analisis kuantitatif yang didasarkan pada penyerapan cahaya oleh suatu molekul pada panjang gelombang ultraviolet (200–400 nm) serta cahaya tampak (400–800 nm). Spektrum cahaya tampak dapat dilihat pada Gambar 3.



VISIBLE SPECTRUM



Gambar 3. Spektrum cahaya tampak (Rafi *et al.*, 2021)

Prinsip dasar teknik ini mengikuti hukum Lambert-Beer, yang menyatakan bahwa absorbansi suatu larutan berbanding lurus dengan konsentrasi zat dan panjang lintasan cahaya (Nelsen and Cox, 2021).

Dalam biokimia, spektrofotometri UV-Vis sering digunakan untuk mendeteksi dan mengukur berbagai biomolekul. Hal ini karena banyak senyawa biologis memiliki gugus kromofor yang dapat menyerap cahaya pada panjang gelombang tertentu. Teknik ini memiliki suatu keunggulan berupa sensitivitas yang tinggi, waktu analisis yang relatif cepat, serta kemudahan dalam operasional.

Enzim keratinase merupakan enzim proteolitik yang mampu menghidrolisis keratin, yakni protein berserat yang resisten terhadap degradasi oleh enzim protease biasa. Aktivitas enzim keratinase tertentu dapat diukur dengan penggunaan spektrofotometri UV-Vis. Hal ini dapat dilakukan dengan mengamati berbagai perubahan absorbansi yang terjadi akibat pelepasan asam amino

aromatik dari substrat keratin, semacam tirosin. Absorbansi diukur pada panjang gelombang sekitar 280 nm (Gurav *et al.*, 2016).

Metode Lowry adalah salah satu teknik kolorimetri. Teknik ini digunakan untuk mengukur kadar protein total dalam sampel. Metode ini secara umum berdasarkan reaksi protein dengan reagen Folin-Ciocalteu setelah pra-reaksi dengan larutan alkali dan tembaga (reaksi Biuret). Reaksi ini menghasilkan suatu kompleks berwarna biru yang dapat diukur keberadaannya pada panjang gelombang 750 nm. Metode ini sensitif terhadap tirosin serta triptofan pada struktur protein, sehingga bisa digunakan untuk menganalisis kadar protein secara akurat, termasuk analisis aktivitas enzim keratinase yang melibatkan degradasi substrat protein, misalnya keratin (Nelsen and Cox, 2021).

III. METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Oktober 2024-Maret 2025 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, termometer, pH meter, mikropipet (Eppendorf), vortex, kuvet, , alat-alat gelas, rak tabung, jarum ose, pembakar spiritus, spatula, pengaduk magnetik, autoklaf (model S-90N), inkubator pengocok (*shaker incubator*), alat sentrifugal, spektrofotometer UV-Vis (Hitachi U 2010), *waterbath*, *Laminar Air Flow* (LAF) CURMA model 9005-FL, dan lemari pendingin.

Adapun bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah, bulu ayam 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, ekstrak ragi, agar, pepton, NaOH , HCl , *buffer phospat*, *buffer Tris-HCl*, kasein, glukosa, Na_2CO_3 , susu skim, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1% larutan Na/K tartrat, reagen folin ciocalteu, BSA, tirosin, TCA, akuades, alumunium foil, kertas saring, dan $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

3.3. Prosedur Penelitian

3.3.1. Tahap Persiapan

a) Penyiapan Alat

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

b) Persiapan Sampel Bulu Ayam

Bulu ayam yang diperoleh dari beberapa RPA di daerah Bandar Lampung dicuci bersih menggunakan deterjen, kemudian dikeringkan dibawah sinar matahari sampai kering, selanjutnya bulu ayam direndam menggunakan campuran kloroform dan metanol dengan perbandingan 1:1 selama 1 jam. Dipisahkan antara bulu ayam dan campuran larutan, setelah itu bulu ayam dikeringkan dengan oven selama 24 jam pada suhu 80°C. Tujuan dilakukannya prosedur ini, agar sampel bulu ayam bebas dari kandungan lipid yang terdapat pada permukaan bulu, sehingga mempermudah akses mikroba atau enzim terhadap keratin atau biasa disebut proses delipidasi (Masruroh, 2024)

c) Pembuatan Media

1. *Skim Milk Agar* (SMA)

Pembuatan media SMA dilakukan dengan cara mencampurkan 1 g *skim milk*; 2 g agar; 0,1 g pepton; 0,5 NaCl; 0,3 glukosa; dan 100 mL akuades ke dalam Erlenmeyer 250 mL. Kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit. Selanjutnya dituangkan ke dalam cawan petri atau tabung reaksi dan dibiarkan memadat pada suhu kamar. Proses ini dilakukan didalam *laminar air flow* (LAF).

2. Luria Bertani (LB)

Pembuatan media LB dilakukan dengan cara mencampurkan 1 g pepton; 1 g NaCl; 0,5 g *yeast extract*; dan 100 mL buffer fosfat 0,05 M pH 7 ke dalam Erlenmeyer 250 mL. Kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit. Kemudian media didinginkan pada suhu kamar.

3. *Feather Meal Liquid* (FML)

Pembuatan media FML dilakukan dengan cara mencampurkan 0,03 g KH_2PO_4 ; 0,04 g K_2HPO_4 ; 0,05 g NH_4Cl ; 0,05 NaCl; 0,01 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 g *yeast extract*; dan pepton 1 % untuk meningkatkan kemampuan mikroba dalam menghasilkan enzim keratinase. Semua bahan tersebut dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 mL kemudian ditambahkan buffer fosfat 0,05 M pH 7 sebanyak 100 mL. Kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit. Media kemudian didinginkan pada suhu kamar sebelum digunakan.

3.3.2. Peremajaan Bakteri

Peremajaan isolat bakteri B-9-6 dilakukan dengan cara menggoreskan 1 ose isolat stok B-9-6 yang ada di laboratorium biokimia, dikultur ke media SMA dengan teknik gores zig-zag. Setelah itu diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator suhu 37°C. Peremajaan ini dilakukan untuk memperoleh isolat yang lebih murni dan memiliki aktivitas yang baik.

3.3.3. Pembuatan Inokulum (*Starter*) Mikroba

Sebanyak 1-2 ose isolat bakteri B-9-6 yang telah diremajakan diinokulasikan pada 100 mL medium LB dalam Erlenmeyer 250 mL. Selanjutnya diinkubasi selama 18 jam menggunakan Shaker Incubator dengan kecepatan 150 rpm.

3.3.4. Uji Biodegradasi Limbah Bulu Ayam

Uji biodegradasi dilakukan dengan tiga kondisi perlakuan, yaitu kontrol tanpa mikroba, perlakuan dengan penambahan isolat B-9-6 tanpa ion logam, dan perlakuan dengan penambahan isolat B-9-6 dengan variasi ion logam divalen. Ion logam yang digunakan berasal dari senyawa garam anorganik terhidrasi, yaitu $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Fe^{2+}), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Cu^{2+}), dan $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Zn^{2+}). Masing-masing garam ditambahkan sesuai berat yang dibutuhkan untuk menghasilkan konsentrasi akhir sebesar 1 mM dalam media FML. Penambahan dilakukan langsung kedalam media.

Sebanyak 0,5 gram bulu ayam kasar dimasukkan ke dalam tabung Erlenmeyer 250 mL yang telah berisi media FML. Media kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan didinginkan hingga suhu ruang. Setelah dingin inokulum isolat B-9-6 sebanyak 10 mL ditambahkan kedalam masing-masing erlenmeyer, kecuali kontrol.

Seluruh perlakuan diinkubasi menggunakan shaker pada kecepatan 150 rpm selama 12 hari. Setelah inkubasi, sisa bulu ayam dipisahkan dari media dengan cara disaring menggunakan kertas saring. Kertas saring kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 100°C selama 24 jam hingga diperoleh berat konstan.

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.

3.3.5. Pengukuran Pertumbuhan Bakteri

Pertumbuhan bakteri dinyatakan sebagai *Optical Density* (OD). Pengukuran OD dilakukan dengan mengambil 0,5 mL kultur, diencerkan dengan menambahkan 4,5 mL aquades lalu dihomogenkan. Lalu diukur serapannya menggunakan

spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 600 nm. Blanko digunakan aquades.

3.3.6. Pengukuran Kadar Asam Amino yang dibebaskan

Kadar asam amino yang dibebaskan diukur dengan cara diambil 0,5 kultur yang telah disentrifugasi, dimasukkan kedalam tabung reaksi. Ditambahkan aquades 4,5 mL, homogenkan. Serapannya diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 280 nm.

3.3.7. Uji Aktivitas Enzim Keratinase

a) Pembuatan Kurva Standar Tirosin

Pembuatan kurva standar tirosin berfungsi untuk menentukan persamaan regresi linier yang nantinya akan diplotkan dengan absorbansi filtrat untuk mengetahui aktivitas unit enzim dan kadar asam amino yang dibebaskan. Pembuatannya yaitu dengan menyiapkan larutan stok standar tirosin 1000 ppm, kemudian diencerkan dengan pengenceran bertingkat dengan konsentrasi 10, 20, 30, 40 ppm. Serapannya diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 280 nm.

b) Pengukuran Aktivitas Enzim

Pengukuran aktivitas enzim dilakukan dengan menggunakan 1% kasein dalam Buffer Tris-HCl 100 mM (pH 8,5) sebagai substrat. 0,5 mL kasein yang telah dibuat, diambil kemudian ditambahkan 0,5 mL supernatan kultur. Campuran kemudian diinkubasi dalam penangas air selama 15 menit dengan suhu 60°C. Reaksi enzimatis dihentikan dengan menambahkan 0,5 mL asam trikloroasetat (TCA) 20%, didiamkan selama 15 menit pada suhu ruang. Selanjutnya larutan disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 6.000 rpm. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 280 nm. Blanko memiliki prosedur yang sama hanya saja kultur diganti dengan 0,5 mL Buffer Tris-HCl 100 mM (pH 8,5). Pengukuran dilakukan untuk mengetahui jumlah enzim yang diperlukan untuk melepaskan jumlah tirosin per menit (Kambhavi *et al.*, 1993).

3.3.8. Penentuan Kadar Protein

a) Pembuatan Kurva Standar *Bovine Serum Albumin* (BSA)

Pembuatan kurva BSA berfungsi untuk menentukan persamaan regresi linier yang kemudian diplotkan dengan absorbansi filtrat untuk mengetahui kadar protein terlarut. Disiapkan larutan stok standar BSA 1000 ppm, kemudian diencerkan dengan pengenceran bertingkat dengan konsentrasi 100, 200, 300, 400, dan 500 ppm. Serapannya diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 750 nm. Blankonya adalah aquades.

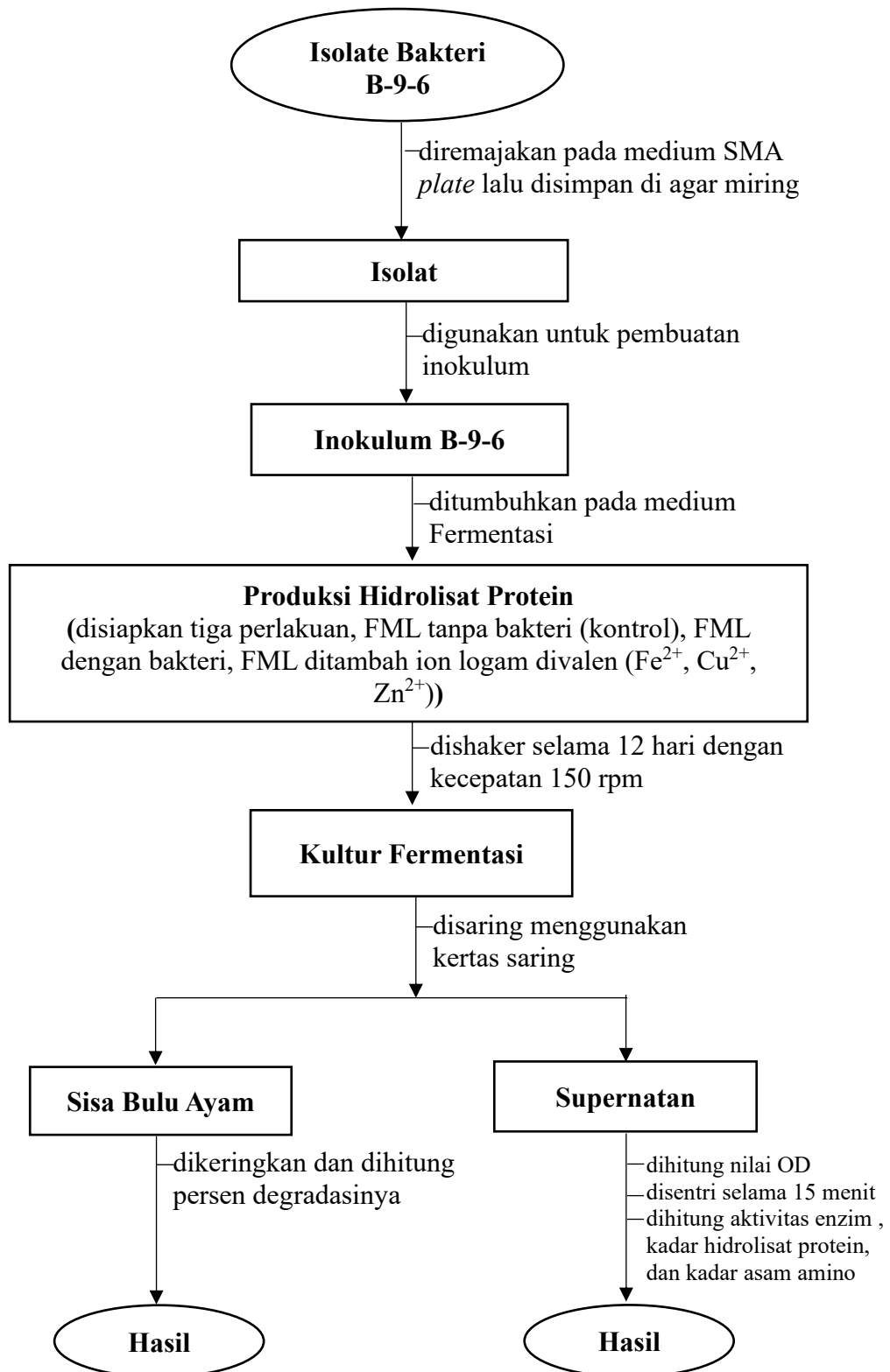
b) Pembuatan Pereaksi

1. Pereaksi A : Pereaksi A : 2 g Na_2CO_3 dilarutkan dalam 100 mL NaOH 0,1N.
2. Pereaksi B : Pereaksi B : 5 mL larutan $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1% ditambahkan kedalam 5 mL larutan Na/K-tartrat 1%
3. Pereaksi C : 2 mL pereaksi B + 100 mL pereaksi A
4. Pereaksi D : Reagen folin ciocelteau diencerkan 1:1 dengan aquades

c) Penentuan kadar protein

Kadar protein enzim ditentukan dengan metode Lowry *et al.*, (1951). Sebanyak 0,1 mL supernatan enzim ditambahkan 0,9 mL aquades, lalu ditambahkan dengan 0,5 mL pereaksi C, campuran dihomogenkan kemudian didiamkan selama 10 menit pada suhu ruang. Selanjutnya tambahkan dengan cepat 0,5 mL pereaksi D dan homogenkan, diamkan kembali selama 30 menit pada suhu kamar. Absorbansinya diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 750 nm. Kontrol disiapkan dengan perlakuan yang sama, hanya saja 0,1 mL enzim diganti dengan 0,1 mL aquades.

3.4. Skema Penelitian



Gambar 4. Skema alur penelitian

V. SIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang telah diperoleh, dapat diambil kesimpulan sebagai berikut :

1. pengaruh penambahan ion logam divalen (Fe^{2+} , Cu^{2+} , dan Zn^{2+}) terhadap kemampuan isolat B-9-6 dalam mendegradasi limbah bulu ayam, menurunkan degradasi hingga 50 % (perolehan % degradasi tertinggi oleh ion logam Fe^{2+} 33,43%) dibandingkan dengan kultur tanpa penambahan ion logam divalen (56,56%)
2. kadar asam amino tertinggi diperoleh pada kondisi kultur tanpa penambahan ion logam divalen (1.096,15 ppm), lebih tinggi dari penambahan ion logam Fe^{2+} (568,68 ppm), Cu^{2+} (750,00 ppm), dan Zn^{2+} (570,33 ppm).
3. kadar protein tertinggi diperoleh pada kondisi kultur tanpa penambahan ion logam divalen yaitu sebesar 1.497,14 ppm, lebih tinggi dibandingkan dengan penambahan ion logam Fe^{2+} (866,57 ppm), Cu^{2+} (724,00), dan Zn^{2+} (885,43 ppm).
4. pengaruh penambahan ion tiga logam divalen terhadap aktivitas enzim keratinase, diperoleh nilai aktivitas enzim tertinggi oleh penambahan ion logam Zn^{2+} (19,35 U/mL) dan ion logam Fe^{2+} (8,57 U/mL), sedangkan kondisi kultur tanpa penambahan ion logam memperoleh nilai aktivitas 6,50 U/mL.

5.2. Saran

Pada penelitian selanjutnya disarankan untuk menggunakan variasi ion logam monovalen seperti misalnya Na^+ dan K^+ yang diharapkan dapat menghasilkan % degradasi yang jauh lebih tinggi.

DAFTAR PUSTAKA

- Ainiwaer, A., Liang, Y., Ye, X., and Gao, R. 2022. Characterization of a novel Fe^{2+} activated non-blue laccase from *Methylobacterium extorquens*. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(17), 9804.
- Anggraini, M. T. 2018. *Isolasi dan Karakterisasi Mikroorganisme Pendegradasi Limbah Bulu Ayam serta Uji Biodegradabilitasnya*. Skripsi. Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Azizah, H., dan Suharti, S. 2024. Effect of addition of divalent metal ions and carbon sources on keratinase production by *Bacillus* sp. MD24, *Salinivibrio proteolyticus* DV TG6, and consortium. In *AIP Conference Proceedings*, 3068(1).
- Badan Pusat Statistik 2024. *Produksi Daging Ayam Ras Pedaging menurut Provinsi (Ton) 2024*. BPS. <https://www.bps.go.id/id/statistics/table/2/NDg4IzI=/broiler-meat-production-by-province.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.
- Bockle, B., Galunsky, B., and Muller, R. 1995. Characterization of a Keratinolytic Serine Proteinase from *Streptomyces pactum* DSM 40530. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 3705–3710.
- Brandelli, A. 2008. Bacterial Keratinase: Useful enzymes For Bioprocessing Agroindustrial Wastes and Beyond. *Food and Bioprocess Technology*, 1(2), 105-116.
- Brandelli, A., Daroit, D. J., and Riffel, A. 2010. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 85, 1735-1750.
- Bressollier, P., Letourneau, F., Urdaci, M., and Verneuil B. 1999. Purification and Characterization of a Keratinolytic Serine Proteinase from *Streptomyces albidoflavus*. *Appl Environ Microbiol*, 65(6), 2570-2576.

- 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.
- Chitte, R., Nalawade, V., and Dey, S. 1999. Keratinolytic activity from the broth of a feather-degrading thermophilic *Streptomyces thermoviolaceus* strain SD8. *Letters in Applied Microbiology*, 28, 131-136.
- Da Silva, R. R. 2018. Keratinases as an alternative method designed to solve keratin disposal on the environment: its relevance on agricultural and environmental chemistry [in-brief]. *J. Agric. Food Chem*, 66(28), 7219-7221.
- De Manazes, C. L. A., Boscolo, M., da Silva, R., and Gomes, E. 2023. The Degradation of Chicken Feathers by *Ochrobactrum Intermedium* Results in Antioxidant and Metal Chelating Hydrolysates and Proteolytic Enzymes for Staphylococcal Biofilm Dispersion. *3 Biotech*, 13(6), 202.
- De Toni, C. H., Richter, M. F., Chagas, J. R., Henriques, J. A., and Termignoni, C. 2002. Purification and characterization of an alkaline serine endopeptidase from a feather-degrading *Xanthomonas maltophilia* strain. *Canadian Journal of Microbiology*, 48(4), 342-348.
- Dias, M. O. S., Maciel and Rossell, C. E.V. 2007. Efficient Colling Of Fermentation in Ethanol Production. *Journal Internasional*, 70, 11.
- Dong, Y. Z., Chang, W. S., and Chen, P. T. 2017. Characterization and overexpression of a novel keratinase from *Bacillus polyfermenticus* B4 in recombinant *Bacillus subtilis*. *Bioresources and Bioprocessing*, 4, 1-9.
- Essien, E., Monago, C. and Edor, E. 2009. Evaluation of the Nutritional and Microbiological Quality of Kunun (A Cereal Based Non-Alcoholic Beverage) in Rivers State, Nigeria. *The Internet Journal of Nutrition and Wellness*, 10(2).
- Friedrich, A. B., and Antrakian G. 1996. Keratin Degradation by *Ferbidobacterium pennavorans*, a Novel Thermophilic Anaerobic Species of the Order Thermotogales. *Appl Environ Microbiol*, 62, 2875 – 2882.
- Gandjar, I., W., Sjamsuridzal, dan Oetari, A. 2006. *Mikrobiologi Dasar dan Terapan*. Yayasan Obor Indonesia. Jakarta.
- Gassesse, A., Kaul, R. H., Gashe, B. A., and Mattiasson, B. 2003. Novel alkaline proteases from alkalophilic bacteria grown on chicken feather. *Enzyme and Microbial Technology*, 32, 519-524.
- Gousterova, A., Braikova, D., Goshev, I., Christov, P., Tishinov, K., Tonkova, V., Nedkov, P. 2005. Degradation of keratin and collagen containing wastes by newly isolated thermoactinomycetes or by alkaline hydrolysis. *Letters in Applied Microbiology*, 40, 335-340.

- Gradisar, H., Kern, S., and Friedrich, J. 2000. Keratinase of *Doratomyces microsporus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53, 196-200.
- Gultom, R., Tampubolon, D., dan Nainggolan, M. 2017. FOLUTAN (Formula Ransum dari Bulu Ayam dan Tulang Ikan) : Inovasi Pakan Ayan Petelur yang Kaya Protein dan Kalsium dalam Upaya Mengoptimalkan Pemanfaatan Limbah Bulu Ayam dan Limbah Tulang Ikan Pasar Tradisional Kota Medan. *Jurnal Saintika*, 17(1), 17-22.
- Gupta, R., and Ramnani, P. 2006. Microbial Keratinases and Their Prospective Applications: an overview. *J. Appl Microbiol Biotechnol*, 70, 21–33.
- Gupta, D. A., Desai, M. L., Malek, N. I., and Kailasa, S. K. 2020. Fluorescence detection of Fe^{3+} ion using ultra-small fluorescent carbon dots derived from pineapple (*Ananas comosus*): Development of miniaturized analytical method. *Journal of Molecular Structure*, 1216.
- Gurav, R. G., Tang, J., and Jadhav, J. P. 2016. Sulfitolytic and keratinolytic potential of *Chryseobacterium* sp. RBT revealed hydrolysis of melanin containing feathers. *3 Biotech*, 6, 1-7.
- Haddar, A., Bougatef, A., Agrebi, R., Sellami-Kamoun, A., and Nasri, M. 2009. A Novel Surfactant-Stable Alkaline Serine-Protease from A Newly Isolated *Bacillus Mojavensis* A21. Purification and Characterization. *Process Biochemistry*, 44(1), 29-35.
- Hadinoto, S., dan Syukroni, I. 2019. Pengukuran Protein Terlarut Air Cucian Gelembung Renang dan Kulit Ikan Tuna menggunakan metode Bradford. *Jurnal Riset Industri*, 15(1), 15-20.
- Ignatova, Z., Gousterova, A., Spasov, G., and Nedkov, P. 1999. Isolation and partial characterization of extracellular keratinase from a wool degrading thermophilic actinomycete strain *Thermoactinomyces candidus*. *Canadian Journal of Microbiology*, 45, 217-222.
- Imtiaz, A., and Rehman, A. 2018. *Bacillus subtilis* BML5 isolated from soil contaminated with poultry waste has keratinolytic activity. *Pakistan Journal of Zoology*, 50(1), 143-148.
- Inonu, I., Kusmiadi, R., dan Mauliana, N. 2016. Pemanfaatan Kompos Bulu Ayam untuk Budidaya Selada di Lahan Tailing Pasir Bekas Penambangan Timah. *Jurnal Lahan Suboptimal*. *Journal of Suboptimal Lands*, 5(2), 145-152.
- Jannah, S. N., Hanifa, Y. R., Utomo, A. B., Prambodo, A. K. D., dan Lunggani, A. T. 2021. Isolasi dan potensi enzim hidrolase bakteri simbiosis *Padina* sp. dari Pantai Lengkuas Belitung. *Bioma: Berkala Ilmiah Biologi*, 23(1), 11-17.
- John, K., Huntress, I., Smith, E., Chou, H., Tollison, T. S., Covarrubias, S., and Peng, X. 2024. Human long noncoding RNA VILMIR is induced by major

- respiratory viral infections and modulates the host interferon response. *Journal of Virology*, 99(4), 141-25.
- Joshi, S. G., Tejashwini, M. M., Revati, N., Sridevi, R., and Roma, D. 2007. Isolation, identification and characterization of a feather degrading bacterium. *International journal of poultry science*, 6(9), 689-693.
- Kambhavi, A. A., Kulkarni, A., and Pant, A. 1993. Salt-Tolerant and Thermostable Alkaline Protease From *Bacillus Subtillis* NCIM No. 64. *Appl. Biochem, Biotechnol*, 38, 83-92.
- Kunert, J. 2000. Physiology of keratinophilic fungi. *Revista Iberoamericana de Micologia*, 1, 77-85.
- Kurniasih, M. F. 2022. *Produksi Hidrolisat Protein dari Limbah Bulu Ayam untuk Bahan Tmbahan Pakan Unggas*. Skripsi. Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Jeevana L. P., Kumari C. C. M., and Lakshmi, V. V. 2013. Efficient degradation of feather by keratinase producing *Bacillus* sp. *International journal of microbiology*, 2013(1), 608321.
- Larasati, D. 2015. *Modifikasi Enzimatik Limbah Bulu Ayam Sebagai Pakan Ternak Kaya Nutrisi*. Skripsi. Institut Teknologi Sepuluh November. Surabaya.
- Latafat, S. M. H., Vimal, A., and Bhargava, P. 2021. Biological degradation of keratin by microbial keratinase for effective waste management and potent industrial applications. *Current Protein and Peptide Science*, 22(4), 304-312.
- Lehninger. 2005. *Dasar-Dasar Biokimia*. Erlangga. Jakarta.
- Lehninger, D., Rafaja, D., Wünsche, J., Schneider, F., Von Borany, J., and Heitmann, J. 2017. Formation of orthorhombic (Zr, Ta) O² in thin Zr-Ta-O films. *Applied Physics Letters*, 110(26).
- Letourneau, F., Soussotte, V., Bressollier, P., Branland, P., and Verneuil, B. 1998. Keratinolytic activity of *Streptomyces* sp. SK102: A new isolated strain. *Letters in Applied Microbiology*, 26, 77-80.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265-275.
- Lucas, F. S., Broennimann, O., Febbraro, I., and Heeb, P. 2003. High Diversity Among Feather-Degrading Bacteria from a Dry Meadow Soil. *Microbial Ecology*, 45, 282–290.
- Luche, S., Eymard-Vernain, E., Diemer, H., Van Dorsselaer, A., Rabilloud, T., and Lelong, C. 2016. Zinc oxide induces the stringent response and major

- reorientations in the central metabolism of *Bacillus subtilis*. *Journal of proteomics*, 135, 170-180.
- Malau, N. D., dan Sianturi, M. 2017. Analisa Jembatan Garam untuk Meningkatkan Kestabilan Termal Enzim Xilanase *Aspergillus niger*. *Jurnal Pendidikan, Matematika dan Sains*, 1(2), 191-201.
- Mamangkey, J., Suryanto, D., Munir, E., Mustopa A. Z. 2020. Keratinase Activity of A Newly Keratinolytic Bacteria, *Azotobacter chroococcum* B4. *J Pure Appl Microbiol*, 14(2), 1203-1211.
- Marzuki, A. R. 2015. *Optimasi Produksi Keratinase Oleh Bakteri Bacillus SLII-I Dalam Medium Limbah Bulu Ayam*. Skripsi. Institut Teknologi Sepuluh November. Surabaya
- Masruroh, A. 2024. *Komparasi Produksi Hidrolisat Protein menggunakan Metode Liquid State Fermentation (LSF) dan Solid State Fermentation (SSF) dari Limbah Bulu Ayam Oleh Isolat B-9-6*. Skripsi. Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Mastuti, I. F. N. 2022. Degradasi Keratin dari Limbah Bulu Ayam oleh konsorsium *Bacillus* SP MD24 dengan *Bacillus Licheniformis* DSM13 menggunakan Metode *Solid State Fermentation*. Skripsi. Universitas Negeri Malang.
- Mathews, S., Hans, M., Mucklich, F., and Solioz, M. 2013. Contact Killing of Bacteria on Copper s Suppressed if Bacterial-Metal Contact is Prevented and is Induced on Iron by Copper Ions. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(8), 2605-2611.
- Miranti, A. A. 2015. Biodegradabilitas Bakteri Isolat Lokal Pendegradasi Linear Alkilbenzen Sulfonat (Las). *Skripsi*. Univeritas Lampung. Lampung.
- Mirdayanti, R., dan Amalia, A. 2020. Characteristics of edible films based on corn starch and protein isolates from liquid waste extraction of tofu processing industry. *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi*, 23(6), 216-221.
- Mukhopadhyay, R., and Chandra, A. 1990. Keratinase of a streptomycete. *Indian Journal of Experimental Biology*, 28, 575-577.
- Mulia, D. S., Husin, A., dan Wuliandari, J. R. 2022. Kandungan Asam Amino Tepung Bulu Ayam yang Difermentasi dengan *Bacillus licheniformis* B2560 dan *Bacillus subtilis* sebagai Bahan Baku Pakan Ikan. *Sainteks*, 18(2), 155-167.
- Nam, G. W., Lee, D. W., Lee, H. S., Lee, N. J., Kim, B. C., Choe, E. A., and Pyun, Y. R. 2002. Native-feather degradation by *Fervidobacterium islandicum* AW-1, a newly isolated keratinase-producing thermophilic anaerobe. *Archives of Microbiology*, 178(6), 538-547.

- Nelsen, D. L., and Cox, M. M. 2021. *Lehninger principles of biochemistry*. Macmillan Learning.
- Nascimento, W. C. A. D., and Martins, M. L. L. 2004. Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp. *Brazilian journal of microbiology*, 35, 91-96.
- Nor, F., Sunarto, W. and Prasetya, A. T. 2014. Sintesis Biomassa Bulu Ayam Teraktivasi $\text{NaOH}/\text{Na}_2\text{SO}_3$ Aplikasinya Penurun Kadar Tembaga Limbah Elektroplating. *Indonesian Journal of Chemical Science*, 3(2).
- Novel, J., and Nickerson, W. 1959. Decomposition of native keratin by *Streptomyces fradiae*. *Journal of Bacteriology*, 77, 251-263.
- OpenStax. 2016. *Microbiology*. OpenStax. Rice University.
- Poernomo, A. T., Isnaeni, S., Purwanto, D. A., Dewi, A. C., dan Suryagama, D. 2017. Pengaruh nutrisi pada produksi dan karakterisasi protease dari bakteri termofilik isolat LS-1 lumpur sidoarjo. *Jurnal Farmasi Dan Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 4(2), 52-59.
- Purworini, S. B. 2023. Optimasi Produksi dari Limbah Bulu Ayam menggunakan Bakteri Isolat Lokal B-9-6. *Sripsi*. Universitas Lampung
- Puspawati, N. M., Dewi, P. P., Bogoriani, N. W., dan Ariati, N. K. 2020. Produksi Hidrolisat Protein Antioksidan Melalui Hidrolisis Enzimatik Protein Kulit Ayam Broiler Dengan Enzim Papain. *Jurnal Kimia*, 14(2), 206-212.
- Quanti, M. 2015. *Isolasi dan Potensi Bakteri Keratinolitik dari Feses Buaya (Crocodylus sp.) dalam Mendegradasi Limbah Keratin*. Doctoral dissertation. Universitas Sumatera Utara. Medan.
- Rafi, M., Wahyuni, W. T., Arif, Z., and Heryanto, R. 2021. Autentikasi kumis kucing (*Orthosiphon aristatus*) menggunakan kombinasi spektrum ultraviolet-tampak dan partial least square regression. *Indonesian Journal of Chemometrics and Pharmaceutical Analysis*, 93-101.
- Rahmawati, D., and Griyanitasari, G. 2019. Produksi Hidrolisat Keratin dari Bulu Domba Limbah Industri Penyamakan Kulit menggunakan Kombinasi Basa dan Enzim. *IPTEK Journal of Proceedings Series*, 4, 32-35.
- Realita, T., dan Debby, S. M. 2009. *Teknologi Fermentasi*. Widya padjajaran. Bandung.
- Riffel, A., and Brandelli, A. 2006. Keratinolytic bacteria isolated from feather waste. *Braz. J. Microbiol*, 37(3), 395–399.
- Rissen, S., and Antranikian, G. 2001. Isolation of *Thermoanaerobacter keratinophilus* sp. nov., a novel thermophilic, anaerobic bacterium with keratinolytic activity. *Extremophiles*, 5, 399-408.

- 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.
- 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.
- Sangali, S., and Brandelli, A. 2000. Feather keratin hydrolysis by a *Vibrio* sp. strain kr2. *Journal of Applied Microbiology*, 89, 735-743.
- Saramousavi, S. M., Salouti, R., Shapoury, and Heidari, Z. 2013. Research article: optimization of keratinase production for feather degradation by *Bacillus subtilis*. *Jundishapur J. Microbiol*, 6(8), 1-5.
- 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.
- Sari, E. P., Putri, I. S. T., Putri, R. A., Imanda, S., Elfidasari, D. dan Puspitasari, R. L. 2015. Pemanfaatan limbah bulu ayam sebagai pakan ternak ruminansia. *Pros. Sem. Nas. Masy. Biodiv. Indon*, 1(1), 136-138.
- Scopes, R. K. 1994. Analysis—Measurement of Protein and Enzyme Activity. *Protein purification: principles and practice*, 44-70.
- Setyabudi, R. B. 2015. *Aktivitas Keratinolitik Aspergillus Niger pada Tepung Bulu Ayam menggunakan Solid State Fermentation (SSF)*. Skripsi. Universitas Jember. Jawa Timur.
- Sharma, I., Pranaw, K., Soni, H., Rawat, H. K., and Kango, N. 2022. Parametrically optimized feather degradation by *Bacillus velezensis* NCIM 5802 and delineation of keratin hydrolysis by multi-scale analysis for poultry waste management. *Scientific Reports*, 12(1), 17118.
- Sinoy, S., Bhausheb, T. C. P., and Rajendra, P. P. 2011. Isolation and Identification of Feather Degradable Microorganism. *VSRD-TNTJ*, 2(3), 128-136.
- Sriningsih, A., dan Shovitri, M. 2015. Potensi isolat bakteri *Pseudomonas* sebagai pendegradasi plastik. *Jurnal Sains dan Teknologi ITS*, 4(2), 67-70.
- Srivastava, B., Khatri, M., Sings, G., and Arya, S. K. 2020. Microbial Keratinases: An overview of Biochemical Characterization and its Eco-Friendly Approach for Industrial Applications. *Journal of Cleaner Production*, 252, 1-26.

- Suharti, S., Riesmi, M. T., Hidayati, A., Zuhriyah, U. F., Wonorahardjo, S., and Susanti, E. 2018. Enzymatic Dehairing of Goat Skin Using Keratinase from *Bacillus* sp. MD24, A Newly Isolated Soil Bacterium. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, 41(3).
- Sumardi, S., Agustrina, R., Irawan, B., dan Selfiana, I. 2018. Pengaruh Paparan Medan Magnet 0, 2 mT pada Ion Logam Fe dan Zn dalam media pertumbuhan terhadap produksi Protease *Bacillus* sp. *Jurnal Ilmu Lingkungan*, 16(2), 173-177.
- Susanti, D., dan Rahmi, S. 2021. Penentuan Kondisi Optimum Produksi Enzim Keratinase oleh *Actinobacillus* Spp. menggunakan Tepung Bulu Ayam Sebagai Substrat Pada Fermentasi Media Cair. *Jurnal Teknologi Pengolahan Pertanian*, 3(1), 19-24.
- Szabo, L., Benedek, A., Szabo, M., and Barabas, G. 2000. Feather degradation with a ther-motolerant *Streptomyces graminofaciens* strain. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16, 252-255.
- Tamilmani, P., Umamaheshwari, A., Vinayagam, A., and Prakash, B. 2008. Production of an extracellular feather degrading enzyme by *Bacillus licheniformis* isolated from poultry farm soil in namakkal district (tamilnadu). *Int. J. Poult. Sci*, 7(2), 184-188.
- Tesfaye, T., Sithole, B., Ramjugernath, D., and Chuniilall, V. 2017. Valorisation of chicken feathers: Characterisation of chemical properties. *Waste Management*, 68, 626-635.
- Thompson, M. W. 2022. Regulation of Zinc-Dependent Enzymes by Metal Carrier Proteins. *Biometals*, 35, 187-213.
- Wahyuni, T., Prestiani, N., Rusmana, D., dan Hasbuna, A. 2023. Pengaruh Dosis Inokulum dan Lama Fermentasi oleh *Bacillus subtilis* Terhadap Kandungan Nutrien Tepung Bulu Ayam. *Jurnal Nutrisi Ternak Tropis dan Ilmu Pakan*, 5(3), 135-146.
- Warnes, S. L., Little, Z. R., and Keevil, C. W. 2015. Human Coronavirus 229E Remains Infectious on Common Touch Surface Materials. *Mbio*, 6(6), 1-10.
- Yamamura, S., Morita, Y., Hasan, Q., Yokoyama, K., and Tamiya, E. 2002. Keratin Degradation A Cooperative Action of Two Enzymes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 294, 1138–1143.
- Yumainismar. 2019. *Biodegradasi Limbah Bulu Ayam oleh Konsorsium Bakteri Isolat Lokal*. Skripsi. Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Zhang, R. X., Wu, Z. W., Cui, H. Y., Chai, Y. N., Hua, C. W., Wang, P., and Yang, T. Y. 2022. Production of surfactant-stable keratinase from *Bacillus cereus* YQ15 and its application as detergent additive. *BMC biotechnology*, 22(1), 26.