



PURIFIKASI PARSIAL DAN KARAKTERISASI ENZIM KATEPSIN DARI IKAN CAKALANG (*Katsuwonus pelamis*)

Riki Kurniawan, Evira Lisnaina, Alfahreyzha Agung Prasetya, Adz Dzariyaat Khair,
Maria Dolorosa Sare, Dimas Anugrah, Nurlita Tadzila Wijayanti, Tati Nurhayati*
Departemen Teknologi Hasil Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, IPB University
Jalan Agatis Kampus IPB Dramaga, Bogor, Jawa Barat Indonesia 16680

Dikirim: 24 Februari 2026/Disetujui: 7 Juli 2026

*Korespondensi: tnurhayati@apps.ipb.ac.id

Cara sitasi (APA Style 7th): Kurniawan, R., Lisnaina, E., Prasetya, A. A., Khair, A. D., Sare, M. D., Anugrah, D., Wijayanti, N. T., & Nurhayati, T. (2026). Purifikasi parsial dan karakterisasi enzim katepsin dari ikan cakalang (*Katsuwonus pelamis*). *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 29(7), 608-618. <http://dx.doi.org/10.17844/px257759>

Abstrak

Enzim katepsin berperan penting dalam degradasi protein pascapanen ikan terutama memengaruhi stabilitas mutu daging ikan cakalang (*Katsuwonus pelamis*) sebagai komoditas perikanan bernilai tinggi. Penelitian ini bertujuan memurnikan secara parsial dan mengkarakterisasi enzim katepsin dari daging ikan cakalang. Katepsin ikan cakalang diekstraksi, presipitasi amonium sulfat (0-80% saturasi), serta analisis aktivitas enzim, konsentrasi protein, penentuan pH optimum (3-7), suhu optimum (20-60°C), dan kinetika enzim menggunakan hemoglobin sebagai substrat. Hasil penelitian menunjukkan aktivitas spesifik ekstrak kasar $0,67 \pm 0,11$ U/mg, meningkat hingga 7,50 U/mg pada fraksi presipitasi 60-70% (kelipatan pemurnian 11,28 kali dan rendemen 12,98%). Katepsin cakalang optimum pada pH 4 (aktivitas 0,55 U/mg), suhu optimum 40°C (0,70 U/mg), dengan parameter kinetika k_m 4,09% dan V_{maks} 1,59 U/mL. Hal ini mengonfirmasi sifat protease asam yang sensitif terhadap kondisi lingkungan. Temuan ini memberikan dasar pengendalian autolisis untuk memperpanjang umur simpan ikan cakalang.

Kata kunci: aktivitas enzim, amonium sulfat, autolisis, kinetika reaksi, protease

Partial Purification and Characterization of Cathepsins from Skipjack Tuna (*Katsuwonus pelamis*)

Abstract

Cathepsin enzymes are crucial in the post-harvest protein degradation of fish, impacting the quality stability of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) meat, a valuable fishery commodity. This study aimed to partially purify and characterize the cathepsin enzyme from skipjack tuna meat. Post-rigor skipjack tuna cathepsin was extracted, subjected to ammonium sulfate precipitation (0-80% saturation), and analyzed for enzyme activity, protein concentration, optimum pH (3-7), optimum temperature (20-60°C), and enzyme kinetics using hemoglobin as a substrate. The results revealed a specific activity of 0.67 ± 0.11 U/mg in the crude extract, which increased to 7.50 U/mg at the 60-70% precipitation fraction (purification fold of 11.28 times and yield of 12.98%). The skipjack tuna cathepsin exhibited optimum pH and temperature of 4 (activity 0.55 U/mg) and 40°C (0.70 U/mg), respectively, with kinetic parameters of k_m 4.09% and V_{max} 1.59 U/mL. This confirms the sensitivity of acid proteases to environmental conditions. These findings provide a foundation for controlling autolysis to extend the shelf-life of skipjack tuna.

Keywords: ammonium sulfate, autolysis, enzyme activity, enzyme kinetics, protease

PENDAHULUAN

Ikan termasuk organisme yang cepat mengalami proses pembusukan yang kompleks setelah mati, termasuk autolisis enzimatis, oksidasi lemak, dan aktivitas mikroba (Rathod *et al.*, 2022). Enzim proteolitik yang terlepas dari struktur sel memicu perombakan protein miofibril dan sarkoplasma sehingga tekstur daging mengalami pelunakan, kadar nitrogen terlarut meningkat, dan karakteristik sensori menurun (Meiyasa, 2021). Aktivitas proteolitik tersebut berperan besar dalam menentukan kecepatan autolisis dan stabilitas mutu selama penyimpanan. Aktivitas enzimatis dan oksidatif yang terjadi setelah panen menyebabkan perubahan signifikan pada sifat sensorik dan nutrisi, mengakibatkan hilangnya kesegaran, yang dirasakan konsumen sebagai perubahan yang tidak diinginkan pada bau, rasa, dan tekstur, sehingga menimbulkan kekhawatiran serius terhadap keamanan pangan (Duarte *et al.*, 2020). Pemahaman mengenai mekanisme aksi enzimatis menjadi aspek penting dalam strategi pengendalian mutu, terutama pada komoditas ikan yang memiliki sifat mudah rusak.

Enzim katepsin pada ikan adalah kelompok protease (pemecah protein) yang paling aktif saat ikan mati. Enzim katepsin lisosom dianggap memiliki efek biologis penting pada degradasi protein intraseluler dan ekstraseluler selama katabolisme (Ahmed *et al.*, 2015; Yadati *et al.*, 2020). Selain itu, kerusakan protein dapat mengubah struktur intraseluler dan interseluler protein miofibril dengan membentuk senyawa karbonil, mengoksidasi gugus sulfhidril menjadi ikatan disulfida, dan mengubah hidrofobisitas permukaan, yang menyebabkan penurunan kualitas produk perairan. Enzim ini mampu memecah protein struktural penting yaitu aktin, miosin, dan protein sarkoplasma lain, sehingga degradasinya memberikan dampak langsung pada kekenyalan, kekompakan, dan tekstur daging (Yoshida *et al.*, 2015; Kwon *et al.*, 2021). Karakteristik katepsin yang sensitif terhadap pH, suhu, dan interaksi dengan substrat menjadikan enzim ini penentu utama tingkat kecepatan kemunduran mutu (Rozi *et al.*, 2020). Analisis karakteristik katepsin

menjadi langkah kritis untuk memahami faktor biokimia yang memengaruhi stabilitas protein ikan serta dasar ilmiah dalam pengembangan metode konservasi yang lebih efektif.

Penelitian di Indonesia tentang enzim katepsin dari daging ikan telah melibatkan beberapa spesies ikan lokal, terutama yang umum di perairan Indonesia. Jenis ikan yang digunakan mencakup ikan bandeng (*Chanos chanos* Forskall) (Nurhayati *et al.*, 2012; Nurhayati *et al.*, 2015a), patin (*Pangasius djambal*) (Fikri *et al.*, 2014; Kusuma *et al.*, 2020), limbah cair surimi (Nurhayati *et al.*, 2015b), lele (*Clarias* sp.) (Rozi *et al.*, 2020), dan tonang (*Congresox talabon*) (Pertiwi *et al.*, 2020). Aktivitas katepsin berbeda-beda tiap fraksi daging dan spesies ikan. Informasi mengenai kondisi optimal enzim katepsin dari ikan cakalang bekerja belum dilaporkan.

Ikan cakalang (*Katsuwonus pelamis*) memiliki peranan penting sebagai komoditas perikanan bernilai ekonomi tinggi dengan tingkat konsumsi yang luas (Wibowo *et al.*, 2021; Maskur *et al.*, 2025; Ratnawati *et al.*, 2025). Daging ikan cakalang menunjukkan kerentanan terhadap degradasi protein akibat tingginya aktivitas enzim endogen (Stagg *et al.*, 2012), sehingga perubahan tekstur dapat muncul lebih cepat dibandingkan beberapa spesies lain. Komposisi protein, struktur jaringan, serta aktivitas metabolik *pasca mortem* pada berbagai jenis ikan berpotensi menghasilkan profil katepsin yang berbeda (Chéret *et al.*, 2007). Karakterisasi katepsin melalui pengukuran aktivitas enzim, konsentrasi protein, aktivitas spesifik, pH optimum, suhu optimum, serta respons terhadap substrat memberikan pemahaman menyeluruh mengenai kondisi lingkungan yang memaksimalkan proteolisis. Nilai pH otot yang terus berubah *pasca mortem* sering kali bergerak mendekati pH optimum katepsin, sehingga periode tersebut menjadi titik kritis kemunduran mutu (Nurjanah *et al.*, 2011; Nurhayati *et al.*, 2015). Suhu penyimpanan yang tidak stabil dapat mempercepat aktivitas enzim sebelum denaturasi terjadi, sehingga suhu optimum diperlukan untuk merancang penanganan termal yang aman dan efisien.



Analisis aktivitas katepsin pada fraksi presipitasi, baik pelet maupun supernatan, memberikan gambaran mengenai distribusi enzim dan karakter kelarutannya dan intensifikasi aktivitas proteolitik selama autolisis. Penelitian ini memberikan informasi kondisi optimum enzim katepsin yang bermanfaat dalam proses penanganan ikan cakalang yang tepat. Proses penanganan tersebut dapat dikontrol dengan menghindari kondisi-kondisi lingkungan yang dapat meningkatkan kerja enzim katepsin secara optimal. Penelitian ini bertujuan menentukan karakteristik dan purifikasi parsial enzim katepsin dari ikan cakalang melalui pengukuran aktivitas enzim, penentuan konsentrasi protein, perhitungan aktivitas spesifik, analisis kondisi pH dan suhu optimum, serta pemisahan fraksi protein menggunakan presipitasi amonium sulfat.

BAHAN DAN METODE

Ekstraksi Enzim Katepsin

Ekstraksi dilakukan dengan preparasi sampel untuk memperoleh ekstrak kasar katepsin. Proses ekstraksi menggunakan ikan cakalang yang sudah *post rigor*. Daging ikan diambil dan disuspensikan dalam akuades dengan perbandingan 1:1, lalu dihomogenisasi pada suhu 0-4°C. Ekstrak daging hasil homogenisasi disentrifugasi pada 600×g selama 10 menit dan supernatan yang diperoleh kemudian disentrifugasi lagi pada 10.000×g selama 10 menit. Pelet yang dihasilkan dari hasil sentrifugasi kedua kemudian dilarutkan dalam 0,1 M buffer Tris HCl pH 7,4 dengan jumlah yang sama seperti jumlah akuades tadi dan disentrifugasi pada 4.000×g selama 10 menit. Hasil supernatan (ekstrak kasar katepsin) yang diperoleh merupakan protein utama dari mitokondria dan lisosom yang siap untuk diteliti aktivitasnya lebih lanjut. Analisis yang dilakukan meliputi aktivitas enzim katepsin (Dinu *et al.* 2002), konsentrasi protein (Bradford 1976), dan aktivitas spesifik enzim. Aktivitas spesifik enzim (U/mg) dihitung dengan membagi aktivitas enzim (U/mL) dengan konsentrasi protein (mg/mL).

Presipitasi

Katepsin semi murni diperoleh dengan mengendapkan ekstrak kasar katepsin dibagi menjadi 7 fraksi menggunakan amonium sulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dengan tingkat kejenuhan 0-20%, 20-30%, 30-40%, 40-50%, 50-60%, 70%-80% (b/v). Pengendapan dilakukan dengan menambahkan garam amonium sulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ke dalam supernatan sedikit demi sedikit dan disentrifugasi pada 10.000×g, suhu 4°C selama 10 menit.

Karakterisasi Enzim Katepsin

Karakterisasi enzim katepsin dilakukan menggunakan ekstrak kasar yang diperoleh dari daging ikan cakalang. Tahapan karakterisasi mencakup penentuan suhu optimum, pH optimum, konsentrasi substrat optimum, serta penilaian parameter kinetika enzim.

Penentuan suhu optimum

Penentuan suhu optimum dilakukan dengan melakukan variasi suhu inkubasi pada saat pengujian aktivitas katepsin dengan suhu 20, 30, 40, 50, dan 60°C. Hemoglobin sebagai substrat dibuat dengan konsentrasi 2% pH 2.

Penentuan pH optimum

Penentuan pH optimum dilakukan menggunakan pH substrat dan pH bufer yang sama dengan variasi pH 3, 4, 5, 6, 7. Substrat yang digunakan adalah hemoglobin 2%.

Penentuan substrat optimum

Karakterisasi konsentrasi substrat dilakukan dengan mengubah konsentrasi substrat hemoglobin dengan variasi 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; dan 3,0% (b/v). Hemoglobin sebagai substratnya dibuat dengan konsentrasi 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; dan 3,0% (b/v) pH 2 kemudian direaksikan dengan volume enzim yang sama dan diinkubasi dalam kondisi yang seragam.

Penentuan kinetika enzim katepsin

Penentuan kinetika enzim katepsin mengacu pada Lehninger (1997). Kecepatan reaksi awal (V_0) dihitung berdasarkan jumlah produk hasil hidrolisis yang terbentuk. Data

ini dipetakan dalam kurva Michaelis–Menten untuk menggambarkan hubungan antara konsentrasi substrat dan laju reaksi. Parameter kinetika, yaitu K_m dan V_{maks} , ditentukan menggunakan persamaan linear Lineweaver–Burk sebagai representasi kuantitatif dari afinitas katepsin terhadap substrat dan kapasitas maksimum reaksinya.

Aktivitas Katepsin

Aktivitas proteolitik dari katepsin diuji menggunakan hemoglobin sebagai substratnya dengan konsentrasi 2% pH 2. Sebanyak 0,5 mL dari larutan substrat, 0,1 mL buffer Tris pH 7,4 diinkubasi dengan 0,1 mL larutan enzim pada 37°C selama 10 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 2 mL TCA 5% (w/v). Campuran disaring, dan 1 mL filtrat hasil penyaringan ditambah dengan 1 mL pereaksi folin. Campuran kemudian diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 750 nm. Selain itu, dilakukan pula pengukuran untuk larutan blanko dan larutan standar BSA dengan prosedur yang sama seperti larutan sampel hanya untuk larutan blanko dan larutan standar enzimnya digantikan dengan akuades dan tirosin. Unit didefinisikan sebagai banyaknya enzim yang dapat mengubah substrat menjadi 1 μ mol tirosin dalam 1 menit. Aktivitas enzim katepsin dapat dihitung dengan rumus berikut:

$$AU = \frac{(\text{absorbansi sampel} - \text{absorbansi blanko})}{(\text{absorbansi standar} - \text{absorbansi blanko})} \times P \times \frac{1}{T}$$

Keterangan:

AU = jumlah tirosin yang dihasilkan per mL enzim per menit

P = faktor pengenceran

T = waktu inkubasi

Pengukuran Konsentrasi Protein

Konsentrasi protein ditentukan menggunakan metode Bradford dengan *bovine serum albumin* sebagai standar. Persiapan pereaksi Bradford dilakukan dengan cara melarutkan 5 mg *coomassie brilliant blue* G-250 dalam 2,5 mL etanol 95% (v/v), lalu ditambahkan dengan 5 mL asam fosfat 85% (v/v). Jika telah larut dengan sempurna lalu ditambahkan akuades hingga

250 mL dan disaring dengan kertas saring Whatman no. 1 dan diencerkan 5 kali sesaat sebelum digunakan. Konsentrasi protein ditentukan menggunakan metode Bradford dengan cara 0,1 mL enzim dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan 5 mL pereaksi Bradford, diinkubasi selama 5 menit dan diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm. Demikian pula untuk larutan standar dilakukan sama seperti larutan sampel dengan konsentrasi antara 0,1-1,0 mg/mL. Pembuatan larutan standar dilakukan dengan melarutkan *bovine serum albumin* (BSA) dengan konsentrasi 2 mg/mL yang dijadikan sebagai larutan stok. Larutan stok standar kemudian diberi rentang standar pada konsentrasi berkisar 0,1-1,0 mg/mL. Larutan standar diukur nilai absorbansi dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm. Tahap berikutnya adalah membuat kurva standar dengan absorbansi sebagai ordinat (sumbu y) dan konsentrasi protein sebagai absis (sumbu x). Berdasarkan kurva tersebut dapat ditentukan konsentrasi protein dalam sampel.

Analisis Data

Data-data kuantitatif yang diperoleh dari hasil pengujian diolah menggunakan Microsoft Excel 2016. Data disajikan dalam bentuk tabel dan grafik serta dianalisis secara deskriptif. Analisis tersebut mempertimbangkan hasil nilai rata-rata dan standar deviasi yang didapat untuk melihat pengaruh dari setiap perlakuan yang digunakan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Aktivitas Enzim Katepsin Kasar

Ekstraksi kasar enzim katepsin dari daging ikan cakalang (*K. pelamis*) berhasil dilakukan. Hasil analisis menunjukkan bahwa ekstrak kasar memiliki rata-rata aktivitas enzim sebesar $0,21 \pm 0,01$ U/mL dan rata-rata konsentrasi protein $0,3160 \pm 0,03$ mg/mL. Berdasarkan perhitungan tersebut, aktivitas spesifik rata-rata yang diperoleh pada tahap ini adalah $0,6695 \pm 0,107$ U/mg. Nilai aktivitas spesifik ini berfungsi sebagai data awal (*baseline*) kemurnian enzim sebelum proses purifikasi lebih lanjut. Adanya aktivitas



spesifik yang relatif rendah mengindikasikan bahwa enzim target terekstraksi bersama dengan protein non-enzimatis atau protein pengotor dalam jumlah besar.

Secara komparatif, nilai aktivitas spesifik (0,6695 U/mg) berada dalam kisaran yang wajar untuk ekstrak kasar katepsin ikan. Nurhayati *et al.* (2013a) mengekstraksi katepsin dari kulit ikan patin melaporkan aktivitas spesifik ekstrak kasar sebesar 0,8163 U/mg dan Fikri *et al.* (2014) mendapatkan aktivitas spesifik sebesar 0,907 U/mg dari daging ikan patin. Perbedaan nilai ini dapat disebabkan oleh berbagai faktor, termasuk perbedaan spesies ikan, organ sumber enzim, serta kondisi ekstraksi yang sensitif terhadap pH dan suhu (Rozi *et al.*, 2020). Mengingat bahwa katepsin ikan cakalang memiliki karakteristik sebagai *acid protease* yang bekerja optimal pada pH asam (Yoon *et al.*, 2021), maka proses ekstraksi kasar ini berhasil mempertahankan aktivitas katalitiknya. Oleh karena itu, untuk mengatasi tingginya konsentrasi protein pengotor, tahapan pemurnian selanjutnya melalui presipitasi amonium sulfat menjadi penting untuk meningkatkan aktivitas spesifik secara signifikan dan memastikan pemisahan enzim target dari komponen lain.

Presipitasi Enzim Katepsin

Ekstrak kasar yang diperoleh dilakukan presipitasi menggunakan amonium sulfat. Aktivitas spesifik pelet pada beberapa tingkat

konsentrasi amonium sulfat mengalami peningkatan dan mencapai aktivitas optimum pada perlakuan konsentrasi amonium sulfat 60-70% (Figure 1), sementara aktivitas spesifik pada supernatan menunjukkan penurunan aktivitas spesifik.

Berdasarkan Figure 1 dapat dilihat bahwa terdapat peningkatan aktivitas spesifik pelet pada beberapa tingkat konsentrasi ammonium sulfat dan mencapai aktivitas optimum pada pelet dengan konsentrasi ammonium sulfat 60-70%, sementara aktivitas spesifik pada supernatan menunjukkan penurunan aktivitas spesifik. Enzim yang dihasilkan dari presipitasi 60-70% memiliki aktivitas 1,2 U/mL dan kadar protein 0,16 mg/mL sehingga aktivitas spesifiknya sebesar 7,50 U/mg (Table 1). Nurhayati *et al.* (2012) menyebutkan bahwa katepsin yang berasal dari ikan bandeng (*Chanos chanos* Forskall) aktivitas spesifik pelet pada beberapa tingkat konsentrasi amonium sulfat mengalami peningkatan dan mencapai aktivitas optimum pada perlakuan konsentrasi amonium sulfat 70%, sementara aktivitas spesifik pada supernatan menunjukkan penurunan. Enzim yang dihasilkan dari presipitasi 70% memiliki aktivitas spesifik sebesar 4,4643 U/mg dengan kadar protein sebesar 0,2016 mg/mL.

Ammonium sulfat juga digunakan untuk memurnikan enzim katepsin dari ikan tawar meningkat dari 4,0306 U/mg menjadi 5,3475 U/mg (Nurhayati *et al.*, 2013b) dan

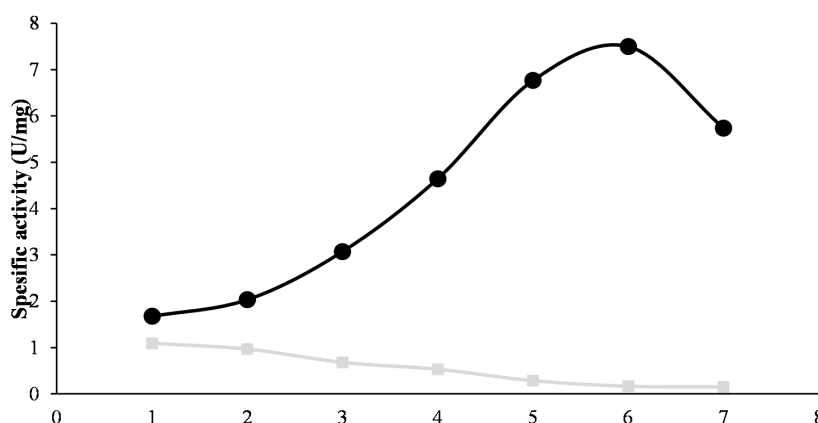


Figure 1 Specific activity of cathepsin after precipitation with ammonium sulfate; —●—: specific activity (pellet), —■— : specific activity (supernatant)

Gambar 1 Aktivitas spesifik katepsin setelah pengendapan dengan ammonium sulfat; —●— :aktivitas spesifik (pelet), —■—: aktivitas spesifik (supernatan)

ikan *Trachurus japonicas*, dengan hasil aktivitasnya meningkat hingga tiga kali lipat dari enzim kasar $1,43 \times 10^{-4}$ U/mg menjadi $3,87 \times 10^{-4}$ U/mg (Yoshida *et al.*, 2015). Sementara hasil penelitian Pertiwi *et al.* (2020) meneliti pemurnian katepsin dari ikan dengan ammonium sulfat meningkatkan aktivitas spesifik dari konsentrasi 40-50% dengan nilai 1,15 U/mg meningkat menjadi 1,4096 U/mg pada konsentrasi 60-70%.

Karakteristik Katepsin

Karakterisasi katepsin dilakukan untuk memperoleh gambaran menyeluruh mengenai sifat katalitik dan respons enzim terhadap berbagai kondisi reaksi yang secara fisiologis relevan bagi proses proteolisis. Analisis ini mencakup evaluasi perubahan aktivitas katepsin pada variasi pH, suhu, dan konsentrasi substrat, serta penentuan parameter kinetika yang menggambarkan afinitas enzim terhadap substrat dan kapasitas maksimum hidrolisisnya.

Tingkat keasaman (pH)

Pengukuran pH optimum dilakukan untuk mengidentifikasi tingkat keasaman yang memberikan aktivitas maksimum bagi enzim katepsin dari ikan cakalang. Rentang pH yang dilakukan yaitu 3 hingga 7. Aktivitas katepsin cenderung aktif pada lingkungan asam (Yadati *et al.*, 2020), karena konfigurasi pusat aktif enzim lebih stabil pada pH rendah, hal ini sesuai dengan pendapat Nurhayati *et al.* (2012) bahwa enzim katepsin aktif pada pH asam misalnya bandeng dengan pH 4, sementara penelitian yang dilakukan Fikri *et al.* (2014) pada daging ikan lele, katepsin memiliki pH optimum 6. Penelitian yang dilakukan oleh Pertiwi *et al.* (2020) terhadap katepsin yang berasal dari ikan *Congresox*

talabon memiliki aktivitas spesifik optimum pada pH 5. Grafik pengaruh pH terhadap aktivitas enzim katepsin pada ikan cakalang terdapat pada *Figure 2*.

Nilai aktivitas katepsin menunjukkan pola peningkatan pada pH rendah dan menurun pada pH yang lebih tinggi. Aktivitas tertinggi dicapai pada pH 4 dengan nilai 0,57 U/mg, sedangkan aktivitas moderat terlihat pada pH 3 (0,45 U/mg) dan pH 5 (0,50 U/mg). Aktivitas enzim mengalami penurunan pada pH 6 (0,44 U/mg) dan mencapai nilai terendah pada pH 7 (0,425 U/mg). Hasil menunjukkan bahwa katepsin ikan cakalang memiliki karakteristik sebagai enzim proteolitik lisosomal yang bekerja optimal pada pH asam, dengan penurunan aktivitas yang konsisten ketika kondisi mendekati netral. Enzim katepsin dari ikan cakalang bersifat *acid protease*, sejalan dengan protease lisosomal yang umum ditemukan pada ikan (Yon *et al.*, 2021). Nilai aktivitas tertinggi pada pH 4 mengindikasikan bahwa pelepasan katepsin dari lisosom pada kondisi pascamortem berpotensi mempercepat degradasi protein ketika pH otot ikan bergerak ke arah asam akibat penurunan glikogen dan pembentukan asam laktat.

Suhu

Pengukuran suhu optimum dilakukan untuk mengidentifikasi tingkat keasaman yang memberikan aktivitas maksimum bagi enzim katepsin dari ikan cakalang. Rentang pH yang dilakukan yaitu 20-60°C. Kenaikan suhu meningkatkan aktivitas spesifik enzim katepsin sampai pada titik tertentu, sementara peningkatan suhu lebih lanjut membuat aktivitas spesifik enzim menurun. Energi kinetik molekul enzim dan substrat meningkat saat suhu naik, menyebabkan tumbukan antar

Table 1 Increase in cathepsin activity

Tabel 1 Peningkatan aktivitas katepsin

Purification stage	Volume (mL)	Activity (U/mL)	Protein (mg/mL)	Specific activity (U/mg)	Protein total (mg)	Activity total (U)	Yield (%)	Purification (fold)
Crude extract	880	0.21	0.3160	0.6645	278.08	184.8	100	1
Precipitation 60%	20	1.2	0.1600	7.4981	3.2	24	12.98	11.28

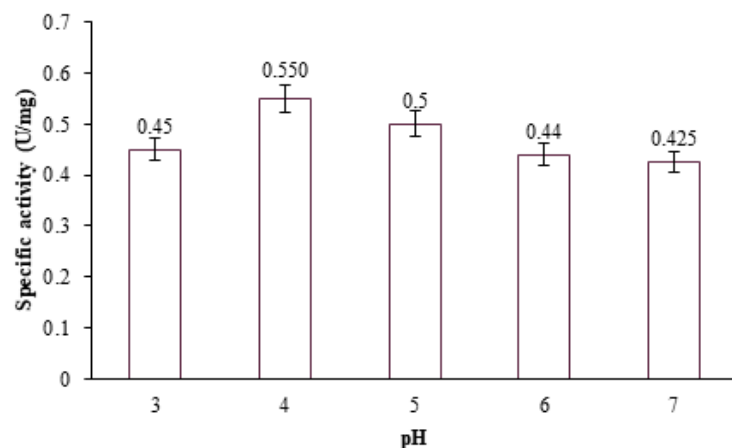


Figure 2 Effect of pH on cathepsin enzyme activity

Gambar 2 Pengaruh pH pada aktivitas enzim katepsin

keduanya lebih sering dan cepat (McLeod *et al.*, 2024). Karakteristik suhu pada enzim katepsin disajikan pada *Figure 3*.

Titik puncak performa enzim atau suhu optimum ditemukan pada suhu 40°C dengan nilai aktivitas tertinggi sebesar 0,70 U/mg. Konfigurasi struktural protein katepsin pada titik ini berada dalam kondisi yang paling ideal, cukup fleksibel untuk mengikat substrat di sisi aktifnya, namun tetap stabil secara termal. Aktivitas spesifik pada suhu optimum ini mencapai 2,215 U/mg, menandakan efisiensi katalitik yang maksimum dibandingkan perlakuan suhu lainnya. Namun, setelah melewati suhu 40°C, terjadi penurunan aktivitas yang sangat signifikan. Aktivitas merosot ke angka 0,26 U/mg pada suhu 50°C, dan terus turun hingga 0,10 U/mg pada suhu 60°C. Hasil ini sejalan dengan penelitian Nurhayati *et al.* (2012)

enzim katepsin ikan bandeng optimum pada suhu 40°C dengan aktivitas spesifik 6,4982 U/mg dan terus turun seiring meningkatnya suhu. Hal tersebut diperkuat penelitian Rozi *et al.* (2020) yaitu enzim katepsin lele optimum pada suhu 30-37°C dengan nilai aktivitas sebesar 0,386-0,439 U/mL.

Penurunan aktivitas enzim mengindikasikan bahwa enzim katepsin mulai mengalami denaturasi termal. Suhu yang terlalu tinggi merusak ikatan hidrogen dan interaksi non-kovalen yang menjaga struktur tiga dimensi enzim, menyebabkan sisi aktifnya berubah bentuk sehingga tidak lagi mampu berikatan dengan substrat secara fungsional. Nalinanon *et al.* (2010) menyatakan bahwa penurunan aktivitas enzim dapat disebabkan proses denaturasi. Denaturasi enzim menyebabkan perubahan struktur sekunder atau tersier serta menyebabkan berkurangnya

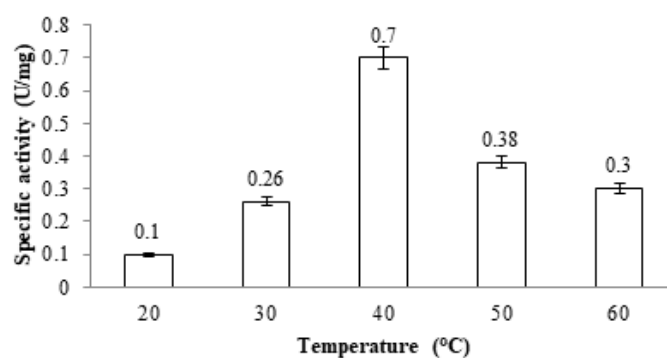


Figure 3 Effect of temperature on cathepsin enzyme activity

Gambar 3 Pengaruh suhu pada aktivitas enzim katepsin

kemampuan katalisis katepsin. Panas berlebih memutuskan ikatan kimia yang menjaga bentuk sisi aktif enzim, membuatnya tidak lagi cocok dengan substrat, sehingga laju reaksi menurun atau enzim kehilangan fungsinya secara permanen (Shaker *et al.*, 2024).

Konsentrasi substrat

Substrat merupakan molekul yang diikat dan diuraikan oleh enzim, sehingga keberadaannya sangat penting dalam menentukan laju reaksi enzimatik. Substrat dalam karakterisasi enzim, berfungsi sebagai komponen utama yang berinteraksi dengan sisi aktif enzim untuk menghasilkan produk reaksi. Penambahan konsentrasi substrat umumnya akan meningkatkan aktivitas enzim hingga mencapai titik tertentu, yaitu saat seluruh sisi aktif enzim telah terikat sepenuhnya. Kondisi ini disebut juga sebagai konsentrasi substrat maksimum atau keadaan saturasi (Rozi *et al.*, 2020). Penambahan substrat pada titik tersebut tidak dapat lagi meningkatkan laju reaksi karena kapasitas enzim telah mencapai batas optimalnya. Substrat yang umumnya digunakan pada enzim katepsin adalah hemoglobin.

Hemoglobin merupakan protein-pigmen kompleks yang mengandung zat besi, memiliki warna merah dan terdapat di dalam eritrosit (Rozi *et al.*, 2020). Protein ini digunakan sebagai substrat karena struktur polipeptidanya relatif mudah dihidrolisis oleh katepsin, sehingga sesuai untuk mengukur aktivitas proteolitiknya. Mekanisme enzim

katepsin menghidrolisis hemoglobin, terjadi ketika katepsin terlebih dahulu berikatan dengan rantai polipeptida hemoglobin melalui sisi aktif enzim yang memiliki residu katalitik spesifik. Kompleks enzim dan substrat yang terbentuk, selanjutnya katepsin akan memutuskan ikatan peptida pada titik-titik tertentu melalui proses katalisis asam basa yang melibatkan gugus aktif pada enzim (Liu *et al.* 2022). Pemutusan ikatan ini menghasilkan fragmen peptida yang berukuran lebih kecil, dan akan terdeteksi melalui peningkatan absorbansi pada panjang gelombang 750 nm.

Berdasarkan hasil pengujian (Figure 4), aktivitas enzim katepsin yang diekstraksi dari ikan cakalang menunjukkan peningkatan seiring dengan bertambahnya konsentrasi hemoglobin. Konsentrasi substrat 0,5% menghasilkan aktivitas sebesar 0,178 U/mL, kemudian meningkat bertahap hingga mencapai 0,722 U/mL pada konsentrasi substrat 2,5%. Rozalia *et al.* (2025) menyebutkan peningkatan efektivitas pada penambahan substrat menunjukkan bahwa semakin banyak molekul substrat yang tersedia, semakin sering terjadi tumbukan efektif antara substrat dan sisi aktif enzim sehingga laju reaksi bertambah.

Aktivitas enzim pada konsentrasi 3% mulai mengalami penurunan, menurut Mbira (2024) hal ini menandakan bahwa sistem mulai mendekati kondisi jenuh atau fase awal *substrate inhibition*, yaitu kondisi ketika kelebihan substrat justru menghambat pembentukan kompleks enzim-substrat.

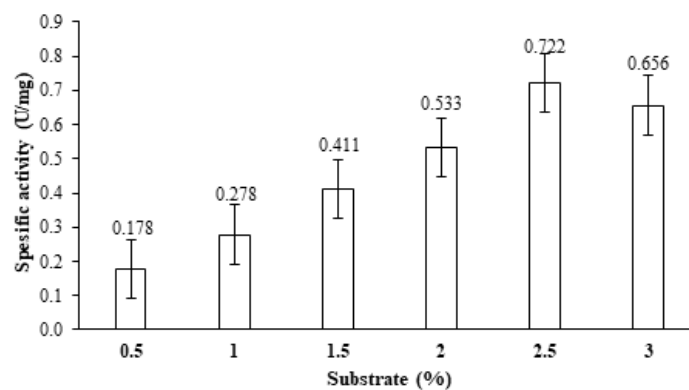


Figure 4 Effect of substrate on the activity of the cathepsin enzyme

Gambar 4 Pengaruh substrat terhadap aktivitas enzim katepsin

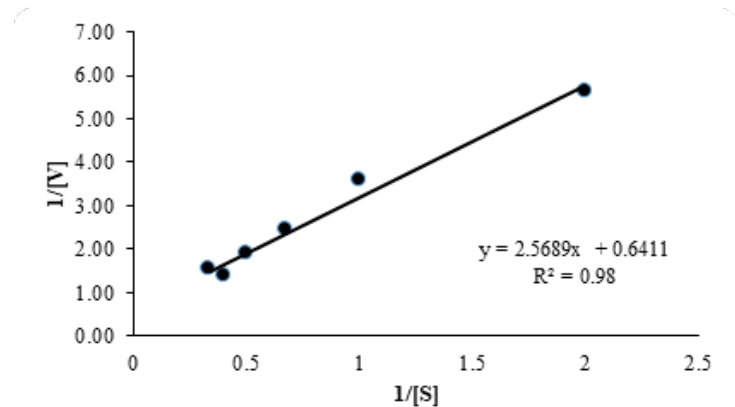


Figure 5 Cathepsin enzyme reaction rate

Gambar 5 Laju reaksi enzim katepsin

Hal tersebut juga dapat disebabkan oleh konsentrasi substrat yang tinggi menyebabkan kompetisi atau gangguan interaksi pada sisi aktif. Pola kenaikan yang menurun setelah konsentrasi 2,5% menunjukkan bahwa enzim telah mendekati kapasitas maksimal, sehingga penambahan substrat tidak lagi menghasilkan peningkatan aktivitas yang signifikan.

Analisis kinetika enzim menggunakan plot *Lineweaver-Burk* (Figure 5) diperoleh bahwa nilai V_{maks} enzim katepsin dalam penelitian ini sebesar 1,588 U/mL, yang menunjukkan kapasitas maksimum enzim ketika seluruh sisi aktif berada dalam kondisi jenuh oleh substrat. Nilai K_m diperoleh sebesar 4,093% (w/v) yang mengindikasikan bahwa enzim membutuhkan konsentrasi hemoglobin sekitar 4,09% untuk mencapai setengah dari kecepatan maksimumnya, sehingga afinitas enzim berada pada kategori sedang. Kondisi ini menunjukkan bahwa pada konsentrasi substrat rendah, laju reaksi masih terbatas karena banyak sisi enzim yang belum berinteraksi dengan substrat. Pola pada hasil ini sejalan dengan beberapa penelitian yang melaporkan bahwa aktivitas katepsin yang diekstraksi dari daging ikan umumnya meningkat tajam pada konsentrasi substrat yang lebih tinggi. Rozi *et al.* (2020) dan Nurhayati *et al.* (2012) melaporkan bahwa kenaikan konsentrasi substrat dari 1,5% hingga 3% menghasilkan peningkatan efektivitas yang signifikan.

KESIMPULAN

Purifikasi parsial enzim katepsin menggunakan fraksi amonium sulfat 60-70% dapat meningkatkan kelipatan pemurnian sebanyak 11,28 kali. Enzim ini optimal bekerja pada pH 4 dan suhu 40°C, dengan afinitas sedang terhadap substrat hemoglobin (K_m 4,09%; V_{maks} 1,59 U/mL). Karakteristik ini mendukung pengembangan strategi penanganan pasca-panen, dengan pengaturan pH dan suhu, untuk menghambat autolisis dan mempertahankan mutu ikan cakalang.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmed, Z., Donkor, O., Street, W. A., & Vasiljevic, T. (2015). Calpains-and cathepsins-induced myofibrillar changes in post-mortem fish: Impact on structural softening and release of bioactive peptides. *Trends in Food Science & Technology*, 45(1), 130-146.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 234-254. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Chéret, R., Delbarre-Ladrat, C., de Lamballerie-Anton, M., & Verrez-Bagnis, V. (2007). Calpain and cathepsin activities in post mortem fish and meat muscles. *Food Chemistry*, 101(4), 1474-1479. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.04.023>

- Dinu, D., Dumitru, I.F., Neichifor, M.T. (2002). Isolation and characterization of two chatepsin from muscle of *Carrassius auratus gibelio*. *Romanian Biotechnological Letters*, 7(3), 753-758.
- Duarte, A. M., Silva, F., Pinto, F. R., Barroso, S., & Gil, M. M. (2020). Quality assessment of chilled and frozen fish—mini review. *Foods*, 9(12), 1739.
- Fikri, M.Z., Nurhayati, T., & Salamah, E. (2014). Ekstraksi dan karakterisasi parsial ekstrak kasar enzim katepsin dari ikan patin. *Jurnal Teknologi Dan Industri Pangan*. 25(1), 119-119.
- Jiang, S.T., Her, Y.H., Lee, J.J., & Jeng, H.W. (2002). Comparison of the cathepsin D from mackerel (*Scomber australasicus*) and milkfish (*Chanos chanos*) muscle. *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry*, 57(4), 571-577.
- Kusuma, F. D., Susanti, R., Anggraini, S., & Arlinda, D. D. (2020). Analisis senyawa inhibitor enzim katepsin kulit ikan patin terhadap penundaan kemunduran mutu cumi-cumi. *Bioeksperimen: Jurnal Penelitian Biologi*, 6(2), 61-67.
- Kwon, C.W., & Chang, P.S. (2021). Role of endogenous cathepsin L in muscle protein degradation in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) surimi gel. *Molecules*, 26(7), 1901. <https://doi.org/10.3390/molecules26071901>
- Lehninger, A.L. (1997). Dasar-dasar Biokimia, Jilid I. Diterjemahkan oleh Thenawidjaya. Jakarta (ID): Erlangga.
- Liu, R. D., Meng, X. Y., Li, C. L., Long, S. R., Cui, J., & Wang, Z. Q. (2022). Molecular characterization and determination of the biochemical properties of cathepsin L of *Trichinella spiralis*. *Veterinary Research*, 53(1), 48. <https://doi.org/10.1186/s13567-022-01065-6>
- Maskur, M., Alauddin, M. H. R., Saridewi, T. R., Siregar, R. R., Kusmedi, B., Najih, M. R., & Harahap, K. S. (2025). The quality of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) on one-day fishing in Gulf of Bone, South Sulawesi, Indonesia. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 28(12), 1017-1029. <http://dx.doi.org/10.17844/v6w0g516>
- Mbira, C. (2024). Influence of substrate concentration on enzyme activity in bio catalysis. *Journal of Chemistry*, 3(1), 48-58. <https://doi.org/10.47672/jchem.1976>
- McLeod., M.J., Barwell, S.A.E., Holyoak, T., & Thorne, R. E. (2024). A structural perspective on the temperature-dependent activity of enzymes. *bioRxiv [Preprint]*. 2024 Aug 23:2024.08.23.609221. doi: 10.1101/2024.08.23.609221. Update in: *Structure*. 33(5), 924-934.e2. <https://doi.org/10.1016/j.str.2025.02.013>.
- Meiyasa, F. (2021). Mikrobiologi hasil perikanan. Banda Aceh: Syiah Kuala University Press.
- Nurhayati, T., Trilaksani, W., & Zaenuri, M. (2015a). Inhibitor katepsin alami untuk menghambat kemunduran mutu ikan bandeng selama penyimpanan suhu dingin. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis*, 7(2), 521-534. <https://doi.org/10.29244/jitkt.v7i2.11024>
- Nurhayati, T., Novanti, H., & Jacob, A. M. (2015b). Recovery enzim katepsin dari limbah cair surimi. *AJIE (Asian Journal of Innovation and Entrepreneurship)*, 4(01), 31-42.
- Nurhayati, T., Salamah, E., & Nico, D. (2012). Purifikasi parsial dan karakterisasi enzim katepsin dari ikan bandeng (*Chanos Chanos* Forskall). *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 15(2), 164-172. <https://doi.org/10.17844/jphpi.v15i2.6208>
- Nurhayati, T., Chasanah, E., & Bahri, S. (2013a). Potensi inhibitor katepsin dari dua spesies dan satu hibrid kulit ikan patin dalam menghambat aktivitas katepsin ikan patin siam. *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*, 8(2), 93-180.
- Nurhayati, T., Rusyadi, S., Suwandi, R., & Nugraha, R. (2013b). Purification and characterization of a cathepsin inhibitor from catfish (*Pangasius* sp.) of Indonesian water. *International Food Research Journal*, 20(2), 941-946.
- Pertiwi, R. M., Pamungkas, I. D., Prastyo, D. T., Trisdiani, D. U., Pasaribu, E., & Nurhayati, T. (2020). Cathepsin



- characterization from crude extract of yellow pike (*Congresox talabon*). In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 404(1), 012013. IOP Publishing.
- Rathod, N. B., Nirmal, N. P., Pagarkar, A., Özogul, F., & Rocha, J. M. (2022). Antimicrobial impacts of microbial metabolites on the preservation of fish and fishery products: A review with current knowledge. *Microorganisms*, 10(4), 773. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040773>
- Ratnawati, S. E., Sari, L. P., Agustyar, A. A., & Puspita, I. D. (2025). *Morganella morganii* growth in skipjack tuna under different storage conditions and histamine detection using TLC method. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 28(11), 917-931. <http://dx.doi.org/10.17844/4mms8195>
- Rozi, A., Khairi, I., Cahyani, R.T., Bija, S., Nurhikma, N., Wulansari, N., & Nurhayati, T. (2020). Aktivitas enzim katepsin pada ikan lele (*Clarias* sp.) pada perlakuan suhu dan substrat yang berbeda. *Jurnal Perikanan Tropis*, 7(2), 211-221. <https://doi.org/10.35308/jpt.v7i2.2390>
- Rozalia, R., Permata, D. A., Sari, D. N., & Sara, A. (2025). Karakteristik enzim invertase dari *Saccharomyces cerevisiae* pada berbagai kondisi. *GreenTech*, 2(1), 92-100. <https://doi.org/10.25077/greentech.v2i1.38>
- Shaker, L. M., Mahmood, A. F., Mohammad, Z. R., Hussain, F. F., Al-Amiery, A., Mohammed, S. A., & Fayad, M. A. (2024). Biodegradation of polymeric contact lenses: a comprehensive review of biological activity. *Results in Surfaces and Interfaces*, 17, 100338. <https://doi.org/10.1016/j.rsurfi.2024.100338>
- Stagg, N.J., Amato, P.M., Giesbrecht, F., & Lanier, T.C. (2012). Autolytic degradation of skipjack tuna during heating as affected by initial quality and processing conditions. *Journal of food science*, 77(2), C149-C155. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02543.x>
- Wibowo, B.A., Aiman, A.M.A., & Setyawan, H.A. (2021). Strategi pengembangan komoditas unggulan perikanan tangkap di Kabupaten Sinjai. *Journal of Marine Research*, 10(4), 481-492. <https://doi.org/10.14710/jmr.v10i4.31570>
- Yadati, T., Houben, T., Bitorina, A., & Shiri-Sverdlov, R. (2020). The ins and outs of cathepsins: physiological function and role in disease management. *Cells*, 9(7), 1679. <https://doi.org/10.3390/cells9071679>
- Yoon, M.C., Solania, A., Jiang, Z., Christy, M.P., Podvin, S., Mosier, C., & Hook, V. (2021). Selective neutral pH inhibitor of cathepsin B designed based on cleavage preferences at cytosolic and lysosomal pH conditions. *ACS Chemical Biology*, 16(9), 1628-1643. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.1c00138>
- Yoshida, A., Ohta, M., Kuwahara, K., Cao, M. J., Hara, K., & Osatomi, K. (2015). Purification and characterization of cathepsin B from the muscle of horse mackerel *Trachurus japonicus*. *Marine drugs*, 13(11), 6550-6565. <https://doi.org/10.3390/md13116550>