

**Isolasi dan Karakterisasi Enzim Kolagenase dari Bakteri
Bacillus spp. dengan Substrat Membran Kerabang Telur
Ayam**

SKRIPSI

Untuk memenuhi sebagian persyaratan mencapai derajat Sarjana S-1 pada
Program Studi Biologi



Disusun oleh :
Amrizal Shalahudin
20106040026

STATE ISLAMIC UNIVERSITY
SUNAN KALIJAGA
YOGYAKARTA

**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UIN SUNAN KALIJAGA
YOGYAKARTA
2025**



PENGESAHAN TUGAS AKHIR

Nomor : B-2000/Un.02/DST/PP.00.9/08/2025

Tugas Akhir dengan judul : Isolasi dan Karakterisasi Enzim Kolagenase dari Bakteri *Bacillus SPP* dengan Substrat Membran Kerabang Telur Ayam.

yang dipersiapkan dan disusun oleh:

Nama : AMRIZAL SHALAHUDIN
Nomor Induk Mahasiswa : 20106040026
Telah diujikan pada : Selasa, 19 Agustus 2025
Nilai ujian Tugas Akhir : A

dinyatakan telah diterima oleh Fakultas Sains dan Teknologi UIN Sunan Kalijaga Yogyakarta

TIM UJIAN TUGAS AKHIR



Valid ID: 68aba092f3460

Ketua Sidang

Jumailatus Solihah, S.Si., M.Biotech.

SIGNED



Valid ID: 68ac57abd3caf

Penguji I

Dr. Isma Kurniatanty, S.Si., M.Si.

SIGNED



Valid ID: 68a82bbedcd5f

Penguji II

Anti Damayanti, H S.Si., M.Mol.Bio.

SIGNED



Valid ID: 68aefb1a4b938

Yogyakarta, 19 Agustus 2025

UIN Sunan Kalijaga

Dekan Fakultas Sains dan Teknologi

Prof. Dr. Dra. Hj. Khurul Wardati, M.Si.

SIGNED

SURAT PERSETUJUAN SKRIPSI

Hal : Persetujuan Skripsi/Tugas Akhir

Lamp : -

Kepada

Yth. Dekan Fakultas Sains dan Teknologi

UIN Sunan Kalijaga Yogyakarta

di Yogyakarta

Assalamu'alaikum wr. wb.

Setelah membaca, meneliti, memberikan petunjuk dan mengoreksi serta mengadakan perbaikan seperlunya, maka kami selaku pembimbing berpendapat bahwa skripsi Saudara:

Nama : Amrizal Shalahudin

NIM : 20106040026

Judul Skripsi : Isolasi dan Karakterisasi Enzim Kolagenase dari Bakteri *Bacillus* spp. dengan Substrat Membran Kerabang Telur Ayam

sudah dapat diajukan kembali kepada Program Studi Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Sunan Kalijaga Yogyakarta sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Strata Satu dalam Program Studi Biologi.

Dengan ini kami berharap agar skripsi/tugas akhir Saudara tersebut di atas dapat segera dimunaqsyahkan. Atas perhatiannya kami ucapkan terima kasih.

Wassalamu'alaikum wr. wb.

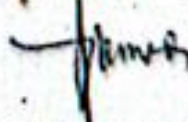
Pembimbing 1



Jumailatus Solihah, S Si, M Biotech
NIP. 197606242005012007

Yogyakarta, 12 Agustus 2025

Pembimbing 2



Dr. Ena Dahayanti, M Biotech
NIP. 198012192005022002

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertandatangan dibawah ini:

Nama : Amrizal Shalahudin
NIM : 20106040026
Program Studi : Biologi

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi ini adalah asli karya atau penelitian sendiri dan bukan plagiasi dari hasil karya orang lain kecuali pada bagian yang dirujuki sumbernya.

Demikian surat pernyataan ini saya buat dengan sesungguhnya agar dapat diketahui oleh anggota dewan penguji.

Yogyakarta, 12 Agustus 2025
Yang menyatakan,



Amrizal Shalahudin
NIM. 20106040026

STATE ISLAMIC UNIVERSITY
SUNAN KALIJAGA
YOGYAKARTA

NOTA DINAS KONSULTASI

Hal : Persetujuan Skripsi/Tugas Akhir
Lamp : -

Kepada
Dekan Fakultas Sains dan Teknologi UIN Sunan Kalijaga Yogyakarta
di Yogyakarta

Assalamu'alaikum wr. wb.

Setelah membaca, meneliti, memberikan petunjuk dan mengoreksi serta mengadakan perbaikan seperlunya, maka kami selaku pembimbing berpendapat bahwa skripsi Saudara:

Nama : Amrizal Shalahudin
NIM : 20106040026
Judul Skripsi : Isolasi dan Karakterisasi Enzim Kolagenase dari Bakteri *Bacillus* spp. dengan Substrat Membran Kerabang Telur Ayam

sudah benar dan sesuai ketentuan sebagai salah satu syarat memperoleh gelar Sarjana Strata Satu dalam bidang Biologi.
Demikian kami sampaikan. Atas perhatiannya, kami ucapkan terimakasih.

Wassalamu'alaikum wr. wb.

Yogyakarta, 12 Agustus 2025

Konsultan 1

Konsultan 2


Jurnailatus Solihah, S.Si, M.Biotech
NIP. 197606242005012007


Dr. Ema Damayanti, M.Biotech
NIP. 198012192005022002

Isolasi dan Karakterisasi Enzim Kolagenase dari Bakteri *Bacillus* spp. dengan Substrat Membran Kerabang Telur Ayam

Amrizal Shalahudin
20106040026

ABSTRAK

Kolagenase adalah enzim proteolitik yang mampu mendegradasi struktur triple heliks kolagen menjadi fragmen peptida kecil. Limbah berupa membran kerabang telur ayam diketahui mengandung konstituen organik seperti kolagen (tipe I, V, dan X) yang belum dimanfaatkan secara optimal. Bakteri *Bacillus* merupakan kelompok mikroorganisme yang paling banyak digunakan dalam industri karena kemampuannya dalam menghasilkan berbagai jenis enzim, termasuk sumber enzim kolagenase. Pada penelitian sebelumnya didapatkan 4 isolat bakteri yang berasal dari pollen lebah yaitu BP1, BPY1, BPY2 dan GMEKP1 dan belum diketahui potensinya dalam menghasilkan kolagenase. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui karakteristik morfologi dan molekuler dari sampel isolat *Bacillus* spp. yang digunakan dalam produksi kolagenase, mengetahui potensi kolagenase ekstraseluler *Bacillus* spp. dengan substrat membran kerabang telur ayam, dan mengetahui karakteristik kolagenase ekstraseluler *Bacillus* spp. dengan substrat membran kerabang telur ayam. Isolat bakteri diamati karakter morfologi dengan mikroskop, pengecatan Gram dan *Scanning Electron Microscope* (SEM). Isolat bakteri dianalisis karakteristik secara molekuler dengan 16s rRNA menggunakan Sanger sekuensing. Kolagenase yang digunakan berasal dari hasil fermentasi isolat sampel dengan substrat membran kerabang telur ayam selama 72 jam. Supernatan hasil fermentasi yang sudah dipisahkan dengan sel bakteri dipresipitasi dengan amonium sulfat (50%) lalu didialisis menggunakan *dialysing tubing cellulose membrane*. Pengujian kolagenase dilakukan uji proteolitik dengan Bovine Serum Albumin serta pengujian menggunakan kolagen tidak larut air (Bovine Achilles Tendon) sebagai substrat uji, dengan asam amino yang dilepaskan menggunakan L-leucine yang direaksikan dengan Ninhidrin. Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) digunakan untuk menunjukkan bobot molekul enzim kolagenase. Hasil karakterisasi morfologi bakteri menunjukkan bahwa semua isolat berbentuk batang dan merupakan Gram positif. Data BLAST-N dari sekuens 16s rRNA mengidentifikasi BPY1 dan KP1 sebagai *Bacillus amyloliquefaciens* (>97%), BP1 sebagai *Bacillus nakamurai* (>97%) dan BPY2 sebagai *Calidifontibacillus erzurumensis* (92,97%). Aktivitas kolagenase enzim kasar dari keempat sampel memiliki nilai 2,6 – 5,6 U/mL dan aktivitas enzim purifikasi antara 0,95 – 6,41 U/mL. Berat molekul enzim kolagenase yang dipurifikasi memiliki nilai 37-46 kDa.

Kata kunci : *Bacillus* spp.; Enzim Kolagenase; Membran Kerabang Telur; Pemurnian Enzim

***Isolation and Characterization of Collagenase Enzyme from Bacillus spp.
Bacteria with Chicken Egg Shell Membrane Substrate***

Amrizal Shalahudin
20106040026

ABSTRACT

Collagenase is a proteolytic enzyme capable of degrading the triple helix structure of collagen into small peptide fragments. Eggshell membrane waste is known to contain organic constituents such as collagen (types I, V, and X) that have not been optimally utilized. Bacillus bacteria are the most widely used group of microorganisms in industry due to their ability to produce various types of enzymes, including collagenase enzymes. In previous studies, four bacterial isolates were obtained from bee pollen, namely BP1, BPY1, BPY2, and GMEKP1, and their potential for producing collagenase has not yet been determined. The aim of this study was to determine the morphological and molecular characteristics of Bacillus spp. isolates used in collagenase production, to determine the potential of Bacillus spp. extracellular collagenase with chicken eggshell membrane substrate, and to determine the characteristics of Bacillus spp. extracellular collagenase with chicken eggshell membrane substrate. Bacterial isolates were observed for morphological characteristics using a microscope, Gram staining, and Scanning Electron Microscope (SEM). Bacterial isolates were analyzed for molecular characteristics using 16S rRNA with Sanger sequencing. The collagenase used was derived from the fermentation of sample isolates with chicken eggshell membrane substrate for 72 hours. The supernatant of fermentation that has been separated with bacterial cells was precipitated with ammonium sulfate (50%) and then dialyzed using dialysing tubing cellulose membrane. Collagenase testing was performed using a proteolytic assay with Bovine Serum Albumin and testing using water-insoluble collagen (Bovine Achilles Tendon) as the test substrate, with amino acids released using L-leucine reacted with Ninhydrin. Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) was used to determine the molecular weight of the collagenase enzyme. Morphological characterization of the bacteria revealed that all isolates were rod-shaped and Gram-positive. BLAST-N data from the 16S rRNA sequence identified as Bacillus amyloliquefaciens (>97%), BP1 as Bacillus nakamurai (>97%) and BPY2 as Calidifontibacillus erzurumensis (92.97%). The crude collagenase enzyme activity of the four samples ranged from 2.6 to 5.6 U/mL, while the purified enzyme activity ranged from 0.95 to 6.41 U/mL. The molecular weight of the purified collagenase enzyme ranged from 37 to 46 kDa.

Keywords: Bacillus spp.; Collagenase Enzyme; Egg Shell Membrane; Enzyme Purification.

MOTTO

وَأَنْ لَّيْسَ لِلْإِنْسَانِ إِلَّا مَا سَعَىٰ

"Dan bahwasanya seorang manusia tiada memperoleh selain apa yang telah diusahakannya."

(QS. An-Najm: 39)

يَرْفَعُ اللَّهُ الَّذِينَ ءَامَنُوا مِنْكُمْ وَالَّذِينَ أُوتُوا الْعِلْمَ دَرَجَاتٍ

"Niscaya Allah akan meninggikan orang-orang yang beriman di antaramu dan orang-orang yang diberi ilmu pengetahuan beberapa derajat."

(QS. Al-Mujadilah: 11)

مَنْ سَلَكَ طَرِيقًا يَلْتَمِسُ فِيهِ عِلْمًا سَهَّلَ اللَّهُ لَهُ بِهِ طَرِيقًا إِلَى الْجَنَّةِ

"Barangsiapa menempuh suatu jalan untuk menuntut ilmu, maka Allah akan memudahkan baginya jalan menuju surga."

(HR. Muslim)

"I'm free to be whatever I, whatever I choose to be."

(Oasis - Whatever)

PERSEMBAHAN

Bismillahirrahmanirrahim.

Karya tulis ini penulis persembahkan untuk almamater tercinta, program studi
Biologi UIN Sunan Kalijaga Yogyakarta.



KATA PENGANTAR

Bismillahirrahmanirrahiim,

Alhamdulillahirabbilalamin, segala puji bagi Allah SWT yang telah melimpahkan Rahmat dan Hidayahnya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Isolasi dan Karakterisasi Enzim Kolagenase dari Bakteri *Bacillus* spp. dengan Substrat Membran Kerabang Telur Ayam” dengan baik. Sholawat serta salam semoga tetap tercurah kepada Nabi Muhammad SAW yang diharapkan syafaatnya kelak di hari akhir. Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan studi jenjang S-1 Program Studi Biologi UIN Sunan Kalijaga Yogyakarta.

Penulis sangat menyadari bahwa skripsi ini dapat selesai berkat bantuan moral dan material dari berbagai pihak. Sehingga, pada kesempatan ini penulis ingin mengucapkan terimakasih kepada:

1. Bapak Gede Riyadi dan Ibu Nur Siti Rahayu selaku orang tua penulis yang selalu memberikan doa dan dukungan penuh.
2. Ibu Dr. Ema Damayanti, S.Si, M.Biotech. selaku dosen pembimbing penelitian yang telah memberikan waktu, arahan, sumber daya, dan dukungan dalam penelitian serta penyusunan skripsi ini.
3. Ibu Jumailatus Solihah, S.Si, M.Biotech. selaku dosen pembimbing yang telah memberikan dukungan dan arahan dalam penyusunan skripsi.
4. Kakak-kakak *Research Assistant* Tsania Tazkia Nabila, M.Biotech., Rosdiana Marzuki, M.Biotech. dan Nisa Raudatul Auli, M.Biotech yang memberikan bantuan dan pengarahan selama penelitian di lab.
5. Teman lab seperjuangan di BRIN yang mensupport tenaga dan waktu selama penelitian, khususnya Zitta Farah Zuhaidah, Riti Musytagfirah Badrun, Muhammad Ghufon Hadyansyah, Nurmaulida Rahma, Desi Permata, Sri Wahyuni, Prasetyo dan Andreana.
6. Bapak Andi Febrisiantosa, Ph.D dan Bapak I Nyoman Guna Darma, M.Pt yang memberikan masukan dan bantuan dalam penelitian.
7. Seluruh peneliti, staff dan mahasiswa di Laboratorium BRIN kawasan Umar Anggara Jenie, Playen, Gunungkidul.
8. Ibu Dr. Ika Nugrahaeni Ari Martiwi, S.Si., M.Si., selaku ketua Program Studi Biologi UIN Sunan Kalijaga Yogyakarta.
9. Seluruh jajaran dosen dan tenaga pendidik Program Studi Biologi UIN Sunan Kalijaga Yogyakarta.
10. Seluruh teman-teman mahasiswa Program Studi Biologi UIN Sunan Kalijaga Yogyakarta.

Yogyakarta, 10 Agustus 2025
Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
SURAT PERSETUJUAN SKRIPSI	iii
SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI.....	iv
NOTA DINAS KONSULTASI.....	v
ABSTRAK	vi
ABSTRACT	vii
MOTTO	viii
PERSEMBAHAN.....	ix
KATA PENGANTAR.....	x
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	4
C. Tujuan Penelitian.....	4
D. Manfaat Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
A. Kolagen	5
B. Enzim Kolagenase.....	10
C. Isolat Bakteri Kolagenase <i>Bacillus spp</i>	11
D. Membran Kerabang Telur Ayam	12
BAB III METODE PENELITIAN	14
A. Waktu dan Tempat Penelitian.....	14
B. Alat dan Bahan.....	14
C. Prosedur Kerja.....	15
D. Analisis Data	20
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	21
A. Hasil Penelitian	21
B. Pembahasan.....	26
BAB V PENUTUP	33
A. Kesimpulan	33
B. Saran.....	33
DAFTAR PUSTAKA.....	34

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Hasil analisis BLAST-N 16s rRNA dari sampel isolat bakteri	22
--	----



DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Hasil peremajaan dan identifikasi dari empat isolat <i>Bacillus</i> spp 1000x mikroskop, 5000x SEM.....	21
Gambar 2. Pohon filogenetik Neighbor-joining sampel BP1, BPY1, BPY2 dan KP1	23
Gambar 3. Hasil enzim kasar (a) dan enzim purifikasi (b).....	23
Gambar 4. Hasil uji pH sampel enzim kolagenase	24
Gambar 5. Hasil uji aktivitas protease sampel enzim.....	25
Gambar 6. Hasil uji aktivitas kolagenase sampel enzim	25
Gambar 7. Gel sampel enzim kasar (a) Gel sampel enzim purifikasi (b) Skala ladder berat molekul (c).	26

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Kolagen adalah protein yang ditemukan dalam matriks ekstraseluler jaringan ikat pada vertebrata (Lima *et al.*, 2015). Kolagen membentuk sekitar 25 - 35 % dari kandungan protein tubuh. Protein ini berperan penting dalam menjaga struktur dan kesehatan kulit, tulang, otot, tendon, dan ligament (Septiani *et al.*, 2023). Kolagen dan turunannya banyak diaplikasikan sebagai bahan untuk minuman, makanan, obat-obatan, kosmetik, dan berbagai produk kesehatan dengan tujuan untuk meningkatkan sifat fungsional produk (Pal & Suresh, 2016).

Besarnya kebutuhan kolagen mendorong pengembangan berbagai variasi metode untuk mengekstrak kolagen. Hingga saat ini, metode yang umum digunakan untuk mengekstrak kolagen dari jaringan hewan adalah dengan cara kimiawi dan secara enzimatis (Schmidt *et al.*, 2016). Metode ekstraksi kolagen secara kimia memiliki skalabilitas dan efektivitas biaya yang lebih baik, namun kualitas kolagen yang dihasilkan kurang begitu baik karena banyak yang terdestruksi oleh bahan kimia ketika proses ekstraksi. Adapun ekstraksi kolagen secara enzimatis menghasilkan produk kolagen yang lebih berkualitas karena enzim hanya menghidrolisis substrat target yakni kolagen dan bukan protein lain pada jaringan (Pal & Suresh, 2016). Sektor industri medis dan kosmetik adalah bidang industri yang sering menggunakan enzim seperti pepsin dalam mengekstraksi kolagen karena menghasilkan produk dengan kemurnian dan bioaktivitas yang lebih tinggi (Sionkowska *et al.*, 2020).

Enzim untuk mengekstrak kolagen dari suatu jaringan adalah enzim protease kolagenolitik atau kolagenase yang terdiri dari domain katalitik dan domain pengikat kolagen guna mengenali dan mendegradasi kolagen (Lima *et al.*, 2015). Enzim tersebut mampu membelah ikatan peptida antara molekul kolagen, yang menyebabkan degradasi struktur triple heliks kolagen menjadi fragmen peptida kecil (Hoa Bach *et al.*, 2020).

Industri halal global yang menuntut jaminan kehalalan di setiap mata rantai pasok memberikan jaminan pada bahan penolong proses seperti enzim. Tanpa adanya sumber enzim yang terjamin halal, produk akhir seperti makanan, obat-obatan, dan kosmetik dapat berstatus *syubhat* (diragukan) atau bahkan haram. Enzim protease seperti kolagenase sering diekstraksi dari pankreas sapi dan babi yang menjadikan status kehalalannya haram untuk babi dan diragukan karena sulitnya verifikasi apakah hewan yang digunakan disembelih secara syariat Islam. Untuk mengatasi masalah fundamental di atas, industri halal membutuhkan sumber kolagenase yang dapat dikontrol. Produksi kolagenase dari bakteri menjadi solusi yang ideal dengan syarat menggunakan strain bakteri non-patogenik dari sumber dan media yang halal (Ayu *et al.*, 2023). Selain itu, enzim kolagenase yang berasal dari bakteri umumnya memiliki kelebihan karena pertumbuhan bakteri yang relatif cepat, mudah diisolasi, ramah lingkungan dan memiliki peluang untuk direkayasa genetik agar memperoleh kualitas enzim yang lebih tinggi (Febrina *et al.*, 2022).

Bakteri yang digunakan untuk produksi enzim kolagenase adalah bakteri dari genus *Bacillus*. Hal tersebut karena *Bacillus* umumnya dianggap aman untuk produksi enzim kolagenase serta mampu memproduksi sejumlah besar enzim ekstraseluler (20-25 g/L) (Lima *et al.*, 2015). Isolat bakteri yang digunakan adalah 4 isolat *Bacillus* yang memiliki kemampuan untuk memproduksi metabolit maupun enzim penting yakni BP1, BPY1, BPY2 dan GMEKP1 dari hasil penelitian di Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN) dan Universitas Gadjah Mada (UGM).

Substrat yang digunakan untuk menghasilkan enzim kolagenase adalah substrat yang memiliki kandungan kolagen di dalamnya (Gautam & Azmi, 2017). Produksi skala industri terkadang menggunakan limbah dari industri lain sebagai substrat serta sebagai sumber karbon dan nitrogen bagi pertumbuhan mikroba. Substrat dari limbah industri biasanya berupa bahan kaya akan kolagen kompleks seperti kulit hewan, tendon dan tulang (Ayu *et al.*, 2023). Membran kerabang telur ayam dipilih sebagai substrat pembuatan enzim kolagenase karena total protein penyusunnya sebanyak 10% adalah kolagen (Arias *et al.*, 1991). Kolagen yang berasal dari membran kerabang telur ayam adalah kolagen tipe I, V, dan X (Wahyuningsih *et al.*, 2023). Adapun kolagen hasil dari ekstraksi membran kerabang telur ayam telah teruji tidak memicu reaksi alergi serta autoimun (Ruff *et al.*, 2012). Selain itu, cangkang telur juga menjadi limbah dan masyarakat luas jarang yang mengolahnnya. Sebagai contoh terdapat dua pabrik penetasan telur (*hatchery*) yang beroperasi di Kapanewon Semanu, Gunungkidul, dengan kapasitas produksi 100.000 butir telur tetas/bulan, hal tersebut tentu menghasilkan banyak limbah cangkang telur (Iskandar Setiyawan *et al.*, 2022).

Penelitian isolasi dan karakterisasi enzim kolagenase dari bakteri *Bacillus* spp. dengan substrat membran kerabang telur ayam perlu dilakukan, untuk memanfaatkan limbah cangkang telur ayam. Proses untuk produksi kolagen dengan kualitas dan karakteristik yang memenuhi standar juga dibutuhkan enzim kolagenase yang dengan kemampuan mengekstrak kolagen dengan maksimal. Oleh karena itu, diperlukan isolasi dan karakterisasi terhadap kolagenase ekstraseluler dari isolat *Bacillus* spp. yang digunakan.

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut, berikut adalah rumusan masalah penelitian :

1. Bagaimana karakteristik morfologi dan molekuler dari sampel isolat *Bacillus* spp. yang digunakan dalam produksi kolagenase?
2. Bagaimana potensi kolagenase ekstraseluler *Bacillus* spp. dengan substrat membran kerabang telur ayam?
3. Bagaimana karakteristik kolagenase ekstraseluler *Bacillus* spp. dengan substrat membran kerabang telur ayam?

C. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Mengetahui karakteristik morfologi dan molekuler dari sampel isolat *Bacillus* spp. yang digunakan dalam produksi kolagenase
2. Mengetahui potensi kolagenase ekstraseluler *Bacillus* spp. dengan substrat membran kerabang telur ayam.
3. Mengetahui karakteristik kolagenase ekstraseluler *Bacillus* spp. dengan substrat membran kerabang telur ayam.

D. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai potensi enzim kolagenase dari *Bacillus* spp. untuk mendapatkan produk berupa peptida kolagen dari suatu substrat bahan mentah. Selain itu, untuk memberikan data tentang karakteristik enzim dari *Bacillus* spp.

BAB V

PENUTUP

A. Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah :

1. Empat isolat *Bacillus* spp (BP1, BPY1, BPY2, dan KP1) secara morfologi berbentuk batang dan merupakan bakteri Gram positif. Hasil BLAST-N dari 16s rRNA menunjukkan BPY1 dan KP1 sebagai *Bacillus amyloliquefaciens* (>97%), BP1 sebagai *Bacillus nakamurai* (>97%) dan BPY2 sebagai *Calidifontibacillus erzurumensis* (92,97%).
2. Empat isolat *Bacillus* spp. dengan penambahan membran kerabang telur ayam memiliki potensi aktivitas enzim kolagenase. Aktivitas kolagenase enzim kasar dari keempat sampel memiliki nilai 2,6 – 5,6 U/mL, adapun untuk aktivitas enzim purifikasi antara 0,95 – 6,41 U/mL. Sampel enzim purifikasi yang menunjukkan kemampuan kolagenase paling unggul adalah BP1 dengan nilai aktivitas 6,41 U/mL.
3. Sampel kolagenase yang teridentifikasi karakter berat molekulnya adalah BP1 dengan berat molekulnya 40 dan 42 kDa, serta BPY2 dengan berat molekulnya 37 dan 46 kDa.

B. Saran

Saran dari penelitian ini adalah :

1. Diperlukan penelitian dan eksplorasi lebih lanjut mengenai proses purifikasi enzim kolagenase dari setiap isolat sampel.
2. Diperlukan penelitian pengaplikasian enzim kolagenase dari keempat isolat sampel.

DAFTAR PUSTAKA

- Ace Baehaki dan Maggy T. Suhartono. (2011). Isolasi dan Produksi Kolagenase dari Bakteri *Bacillus Be-1*. *Prosiding Seminar Nasional Hasil Penelitian Tahun 2011*, 18–23.
- ADAMS, J. (2007). Review: Enzyme inactivation during heat processing of food-stuffs. *International Journal of Food Science & Technology*, 26, 1–20. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1991.tb01136.x>
- Al-temimi, W. K. A., Aziz, S. N., & Khalaf, A. A. (2023). Production of partially purified collagenase from *Bacillus licheniformis* and it's use to tenderize aged Buffalo Meat. *Basrah Journal of Agricultural Sciences*, 36(1), 75–89.
- Alipour, H., Raz, A., Zakeri, S., & Dinparast Djadid, N. (2016). Therapeutic applications of collagenase (metalloproteases): A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(11), 975–981. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.07.017>
- Ansorge, H. L., Meng, X., Zhang, G., Veit, G., Sun, M., Klement, J. F., Beason, D. P., Soslowsky, L. J., Koch, M., & Birk, D. E. (2009). Type XIV Collagen Regulates Fibrillogenesis*. *Journal of Biological Chemistry*, 284(13), 8427–8438. <https://doi.org/https://doi.org/10.1074/jbc.M805582200>
- Arias, J. L., Fernandez, M. S., Dennis, J. E., & Caplan, A. I. (1991). Collagens of the chicken eggshell membranes. *Connective Tissue Research*, 26(1–2), 37–45. <https://doi.org/10.3109/03008209109152162>
- Ayu, B. T., Chamnipa, N., & Apiraksakorn, J. (2023). The Potential of an Inexpensive Plant-Based Medium for Halal and Vegetarian Starter Culture Preparation. *Fermentation*, 9(3). <https://doi.org/10.3390/fermentation9030216>
- Baehaki, A. (2012). Purification and characterization of collagenase from *Bacillus licheniformis* F11.4. *African Journal of Microbiology Research*, 6(10), 2373–2379. <https://doi.org/10.5897/ajmr11.1379>
- Baneen, A.-H., & A. Hassan, B. (2023). Advances in Bioresearch Production, purification and characterization of protease from *Bacillus subtilis*. *Advances in Bioresearch*, 14 (2), 23–28. <https://doi.org/10.15515/abr.0976-4585.14.2.2327>
- Banyard, J., Bao, L., & Zetter, B. R. (2003). Type XXIII collagen, a new transmembrane collagen identified in metastatic tumor cells. *Journal of Biological Chemistry*, 278(23), 20989–20994. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210616200>
- Bayraktar, O., Galanakis, C. M., Aldawoud, T. M. S., Ibrahim, S. A., Köse, M. D., & Uslu, M. E. (2021). Utilization of eggshell membrane and olive leaf extract for the preparation of functional materials. *Foods*, 10(4), 1–21. <https://doi.org/10.3390/foods10040806>
- Blaschke, U. K., Eikenberry, E. F., Hulmes, D. J. S., Galla, H.-J., & Bruckner, P. (2000). Collagen XI Nucleates Self-assembly and Limits Lateral Growth of Cartilage Fibrils*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(14), 10370–10378. <https://doi.org/https://doi.org/10.1074/jbc.275.14.10370>
- Chaplin, M. F., & Bucke, C. (1990). *Enzyme technology*. CUP Archive.
- Cheng, M., Takenaka, S., Aoki, S., Murakami, S., & Aoki, K. (2009). Purification and characterization of an eggshell membrane decomposing protease from *Pseudomonas aeruginosa* strain ME-4. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 107(4), 373–378. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2008.12.010>

- Crespo-Bravo, M., Pedersen, R. S., Sun, S., & Karsdal, M. A. (2024). Chapter 17 - Type XVII collagen. In M. A. Karsdal (Ed.), *Biochemistry of Collagens, Laminins and Elastin* (Third Edition) (Third Edit, pp. 153–160). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-443-15617-5.00043-3>
- Daboor, S. M., Budge, S. M., Ghaly, A. E., Brooks, M. S., & Dave, D. (2012). Isolation and activation of collagenase from fish processing waste. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 03(03), 191–203. <https://doi.org/10.4236/abb.2012.33028>
- Dako, E., Bernier, A.-M., Dadie, A., & Jankowski, C. (2012). The Problems Associated with Enzyme Purification. In *Chemical biology* (pp. 19–40). <https://doi.org/10.5772/33307>
- Danial, S., Natsir, H., Dali, S., & Leliani, L. (2019). Production and Characterization of Collagenase From *Bacillus* sp. 6-2 Isolated From Fish Liquid Waste. *Jurnal Akta Kimia Indonesia (Indonesia Chimica Acta)*, 12(1), 58. <https://doi.org/10.20956/ica.v12i1.5924>
- Febrina, M., Setyahadi, S., & Churiyah. (2022). PURIFIKASI DAN KARAKTERISASI ENZIM KOLAGENASE DARI *Bacillus* sp. KUB BPPT CC DENGAN MENGGUNAKAN SUBSTRAT KOLAGEN DARI KULIT CEKER AYAM. *CERATA Jurnal Ilmu Farmasi*, 13(1), 1–9. <https://doi.org/10.61902/cerata.v13i1.454>
- Friedman, M. (2004). Applications of the Ninhydrin Reaction for Analysis of Amino Acids, Peptides, and Proteins to Agricultural and Biomedical Sciences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(3), 385–406. <https://doi.org/10.1021/jf030490p>
- Gautam, M., & Azmi, W. (2017). Screening and isolation of collagenase producing microorganism from proteins waste found in Himalayan region. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, 4(1), 558–565.
- Gelse, K., Pöschl, E., & Aigner, T. (2003). Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55(12), 1531–1546. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.08.002>
- Grässel, S., & Bauer, R. J. (2013). Collagen XVI in health and disease. *Matrix Biology*, 32(2), 64–73. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.matbio.2012.11.001>
- Gudmann, N. S., & Karsdal, M. A. (2016). Chapter 2 - Type II Collagen. In M. A. Karsdal (Ed.), *Biochemistry of Collagens, Laminins and Elastin* (pp. 13–20). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809847-9.00002-7>
- Harrington, D. J. (1996). Bacterial collagenases and collagen-degrading enzymes and their potential role in human disease. *Infection and Immunity*, 64(6), 1885–1891. <https://doi.org/10.1128/iai.64.6.1885-1891.1996>
- Hincke, M. T., Nys, Y., Gautron, J., Mann, K., Rodriguez-Navarro, A. B., & McKee, M. D. (2012). The eggshell: Structure, composition and mineralization. *Frontiers in Bioscience*, 17(4), 1266–1280. <https://doi.org/10.2741/3985>
- Hjorten, R., Hansen, U., Underwood, R. A., Telfer, H. E., Fernandes, R. J., Krakow, D., Sebald, E., Wachsmann-Hogiu, S., Bruckner, P., Jacquet, R., Landis, W. J., Byers, P. H., & Pace, J. M. (2007). Type XXVII collagen at the transition of cartilage to bone during skeletogenesis. *Bone*, 41(4), 535–542. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bone.2007.06.024>
- Ho Bach, T. M., Pham, T. H., Dinh, T. S., & Takagi, H. (2020). Characterization of collagenase found in the nonpathogenic bacterium *Lysinibacillus sphaericus* VN3. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 84(11), 2293–2302. <https://doi.org/10.1080/09168451.2020.1799748>
- Huang, M., Chen, R., & Ren, G. (2017). Secretory expression and purification of *Bacillus licheniformis* keratinase in insect cells. *PLOS ONE*, 12(8), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183764>

- Ibrahim, A. S. S., Al-Salamah, A. A., El-Badawi, Y. B., El-Tayeb, M. A., & Antranikian, G. (2015). Detergent-, solvent- and salt-compatible thermoactive alkaline serine protease from halotolerant alkaliphilic *Bacillus* sp. NPST-AK15: purification and characterization. *Extremophiles*, 19(5), 961–971. <https://doi.org/10.1007/s00792-015-0771-0>
- Iskandar Setiyawan, A., Faiz Karimy, M., Pratiwi, D., Kurniawan Balai Penelitian Teknologi Bahan Alam, T., Jl Yogya-Wonosari Km, B., Gading, D., Playen, K., & Gunungkidul, K. (2022). Cangkang Telur: Karakteristik Limbah Telur Hatchery (Broiler) dan Bakery (Layer) dengan Menggunakan SEM-EDX. *Jurnal Ilmu Dan Teknologi Peternakan Tropis*, 9(1), 116–122. <https://doi.org/10.33772/jitro.v9i1.19854>
- Izu, Y., Sun, M., Zwolanek, D., Veit, G., Williams, V., Cha, B., Jepsen, K. J., Koch, M., & Birk, D. E. (2011). Type XII collagen regulates osteoblast polarity and communication during bone formation. *Journal of Cell Biology*, 193(6), 1115–1130. <https://doi.org/10.1083/jcb.201010010>
- Jadach, B., Mielcarek, Z., & Osmalek, T. (2024). Use of Collagen in Cosmetic Products. *Current Issues in Molecular Biology*, 46(3), 2043–2070. <https://doi.org/10.3390/cimb46030132>
- Khoshnoodi, J., Pedchenko, V., & Hudson, B. G. (2008). Mammalian collagen IV. *Microscopy Research and Technique*, 71(5), 357–370. <https://doi.org/10.1002/jemt.20564>
- Kim, Y. O., Lee, J. K., Kim, H. K., Park, Y. S., & Oh, T. K. (1996). Purification and Characterization of an Alkaline Protease from *Bacillus licheniformis* NS70. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 6(1), 1–6.
- Koch, M., Laub, F., Zhou, P., Hahn, R. A., Tanaka, S., Burgeson, R. E., Gerecke, D. R., Ramirez, F., & Gordon, M. K. (2003). Collagen XXIV, a Vertebrate Fibrillar Collagen with Structural Features of Invertebrate Collagens: SELECTIVE EXPRESSION IN DEVELOPING CORNEA AND BONE*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(44), 43236–43244. <https://doi.org/https://doi.org/10.1074/jbc.M302112200>
- Koch, M., Schulze, J., Hansen, U., Ashwoldt, T., Keene, D. R., Brunken, W. J., Burgeson, R. E., Bruckner, P., & Bruckner-Tuderman, L. (2004). A Novel Marker of Tissue Junctions, Collagen XXII *. *Journal of Biological Chemistry*, 279(21), 22514–22521. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400536200>
- Kühl, T., Mezger, M., Hausser, I., Guey, L. T., Handgretinger, R., Bruckner-Tuderman, L., & Nyström, A. (2016). Collagen VII Half-Life at the Dermal-Epidermal Junction Zone: Implications for Mechanisms and Therapy of Genodermatoses. *Journal of Investigative Dermatology*, 136(6), 1116–1123. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.02.002>
- Kuivaniemi, H., & Tromp, G. (2019). Type III collagen (COL3A1): Gene and protein structure, tissue distribution, and associated diseases. *Gene*, 707, 151–171. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.05.003>
- Kwan, K. M., Pang, M. K. M., Zhou, S., Cowan, S. K., Kong, R. Y. C., Pfordte, T., Olsen, B. R., Sillence, D. O., Tam, P. P. L., & Cheah, K. S. E. (1997). Abnormal compartmentalization of cartilage matrix components in mice lacking collagen X: Implications for function. *Journal of Cell Biology*, 136(2), 459–471. <https://doi.org/10.1083/jcb.136.2.459>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lamandé, S. R., & Bateman, J. F. (2018). Collagen VI disorders: Insights on form and function in the extracellular matrix and beyond. *Matrix Biology*, 71–72, 348–367.

- <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.matbio.2017.12.008>
- Lima, L. A., Cruz Filho, R. F., dos Santos, J. G., & Silva, W. C. (2015). Protease with collagenolytic activity produced by *Bacillus* sp. DPUA 1728 from Amazonian soil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(4), 1217–1223. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822015005030656>
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). *Word-Template_Sample.pdf*. 193(1).
- Marneros, A. G., Keene, D. R., Hansen, U., Fukai, N., Moulton, K., Goletz, P. L., Moiseyev, G., Pawlyk, B. S., Halfter, W., Dong, S., Shibata, M., Li, T., Crouch, R. K., Bruckner, P., & Olsen, B. R. (2004). Collagen XVIII/endostatin is essential for vision and retinal pigment epithelial function. *The EMBO Journal*, 23(1), 89–99. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600014>
- Mensah, R. A., Salim, K., Peszko, K., Diop, S., Wong, T. H., & Chau, D. Y. (2023). The chicken eggshell membrane: a versatile, sustainable, biological material for translational biomedical applications. *Biomedical Materials (Bristol)*, 18(4). <https://doi.org/10.1088/1748-605X/acd316>
- Moore, S., & Stein, W. H. (1948). *Photometric nin-hydrin method for use in the chromatography of amino acids*. 176, 367–388.
- Mullis, K. B. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, 155, 335–350. <https://cir.nii.ac.jp/crid/1572543024197781376>
- Nagano, H., & To, K. A. (2000). Purification of Collagenase and Specificity of Its Related Enzyme from *Bacillus subtilis* FS-2. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 64(1), 181–183. <https://doi.org/10.1271/bbb.64.181>
- Naidu, K. S. B., & Devi, K. L. (2010). Purification and properties of thermostable alkaline protease from *Bacillus subtilis* K-30. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 4(1), 83–90.
- Nakano, T., Ikawa, N. I., & Ozimek, L. (2003). Chemical composition of chicken eggshell and shell membranes. *Poultry Science*, 82(3), 510–514. <https://doi.org/10.1093/ps/82.3.510>
- Olsen, B. R. (1997). Collagen IX. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 29(4), 555–558. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(96\)00100-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1357-2725(96)00100-8)
- Pal, G. K., & Suresh, P. V. (2016). Microbial collagenases: Challenges and prospects in production and potential applications in food and nutrition. *RSC Advances*, 6(40), 33763–33780. <https://doi.org/10.1039/c5ra23316j>
- Park, P. J., Lee, S. H., Byun, H. G., Kim, S. H., & Kim, S. K. (2002). Purification and characterization of a collagenase from the mackerel, *Scomber japonicus*. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 35(6), 576–582. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2002.35.6.576>
- Pedersen, R. S., Sparding, N., Arvanitidis, A., & Karsdal, M. A. (2024). Chapter 28 - Type XXVIII collagen. In M. A. Karsdal (Ed.), *Biochemistry of Collagens, Laminins and Elastin (Third Edition)* (Third Edit, pp. 223–226). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-443-15617-5.00045-7>
- Pequeno, A. C. L., Arruda, A. A., Silva, D. F., Neto, J. M. W. D., Filho, V. M. S., Converti, A., Marques, D. A. V., Porto, A. L. F., & Lima, C. A. (2019). Production and characterization of collagenase from a new Amazonian *Bacillus cereus* strain. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 49(5), 501–509. <https://doi.org/10.1080/10826068.2019.1587627>
- Pihlajaniemi, T., & Rehn, M. (1995). *Two New Collagen Subgroups: Membrane-associated*

- Collagens and Types XV and XVIII* (W. E. Cohn & K. Moldave (eds.); Vol. 50, pp. 225–262). Academic Press. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0079-6603\(08\)60816-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0079-6603(08)60816-8)
- Prakash, P. O., Rayasam, K., Peddireddy, V., & Chaitanya, K. V. (2025). Improved levan production by novel *Calidifontibacillus erzurumensis* LEV207 using one variable at a time approach. *International Microbiology*, 28(5), 1033–1045. <https://doi.org/10.1007/s10123-024-00597-5>
- Prihatiningsih, N., Asnani, A., & Djatmiko, H. A. (2021). Extracellular protease from *Bacillus subtilis* b315 with antagonistic activity against bacterial wilt pathogen (*Ralstonia solanacearum*) of chili. *Biodiversitas*, 22(3), 1291–1295. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d220327>
- Ramadhani, P., & Rukmi, M. I. (2015). Produksi enzim protease dari *A. niger* PAM18A dengan variasi pH dan waktu inkubasi. *Jurnal Akademika Biologi*, 4(2), 25–34.
- Ricard-Blum, S. (2011). The Collagen Family. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(1), 1–19. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004978>
- Rochima, E., Sekar, N., Buwono, I. D., Afrianto, E., & Pratama, R. I. (2016). Isolation and Characterization of Collagenase from *Bacillus Subtilis* (Ehrenberg, 1835); ATCC 6633 for Degrading Fish Skin Collagen Waste from Cirata Reservoir, Indonesia. *Aquatic Procedia*, 7, 76–84. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aqpro.2016.07.010>
- Ruff, K. J., Endres, J. R., Clewell, A. E., Szabo, J. R., & Schauss, A. G. (2012). Safety evaluation of a natural eggshell membrane-derived product. *Food and Chemical Toxicology*, 50(3–4), 604–611. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.12.036>
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406–425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- Sato, K., Yomogida, K., Wada, T., Yorihuzi, T., Nishimune, Y., Hosokawa, N., & Nagata, K. (2002). Type XXVI Collagen, a New Member of the Collagen Family, Is Specifically Expressed in the Testis and Ovary *. *Journal of Biological Chemistry*, 277(40), 37678–37684. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205347200>
- Schallmeyer, M., Singh, A., & Ward, O. P. (2004). Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canadian Journal of Microbiology*, 50(1), 1–17. <https://doi.org/10.1139/w03-076>
- Schmidt, M. M., Prestes Dornelles, R., Mello, R., Kubota, E. H., Mazutti, M., Kempka, A., & Demiate, I. (2016). *Collagen extraction process*. 23, 913–922.
- Scopes, R. K. (1984). Springer advanced texts in chemistry. *Protein Purification: Principles and Practices*, 329. <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Springer+Advanced+Texts+in+Chemistry#0%5Cnhttp://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Springer+advanced+texts+in+chemistry%230>
- Septiani, R. A., Aisyah, D., Cahyati, S. A. W., Ahmad, F., & Gunarti, N. S. (2023). Pemanfaatan Kolagen Dari Hewan. *Jurnal Buana Farma*, 3(2), 24–32. <https://doi.org/10.36805/jbf.v3i2.600>
- Serwanja, J., Wieland, A., Haubenhofer, A., Brandstetter, H., & Schönauer, E. (2024). A conserved strategy to attack collagen: The activator domain in bacterial collagenases unwinds triple-helical collagen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 121, e2321002121. <https://doi.org/10.1073/pnas.2321002121>
- Shahrajabian, M. H., & Sun, W. (2024). Mechanism of Action of Collagen and Epidermal Growth Factor: A Review on Theory and Research Methods. *Mini-Reviews in*

- Medicinal Chemistry*, 24, 453–477.
<https://doi.org/10.2174/1389557523666230816090054>
- Shaikh, I. A., Turakani, B., Malpani, J., Goudar, S. V., Mahnashi, M. H., Hamed Al-Serwi, R., Ghoneim, M. M., El-Sherbiny, M., Abdulaziz Mannasaheb, B., Alsaikhan, F., Sindagimath, V., Khan, A. A., Muddapur, U. M., Azzouz, S., Mohammed, T., & Shakeel Iqbal, S. M. (2023). Extracellular Protease Production, Optimization, and Partial Purification from *Bacillus nakamurai* PL4 and its Applications. *Journal of King Saud University - Science*, 35(1), 102429.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jksus.2022.102429>
- Shenoy, M., Abdul, N. S., Qamar, Z., Bahri, B. M. Al, Al Ghalayini, K. Z. K., & Kakti, A. (2022). Collagen Structure, Synthesis, and Its Applications: A Systematic Review. *Cureus*, 14(5), e24856. <https://doi.org/10.7759/cureus.24856>
- Sionkowska, A., Adamiak, K., Musial, K., & Gadomska, M. (2020). Collagen based materials in cosmetic applications: A review. *Materials*, 13(19).
<https://doi.org/10.3390/MA13194217>
- Söderhäll, C., Marenholz, I., Kerscher, T., Rüschenhoff, F., Esparza-Gordillo, J., Worm, M., Gruber, C., Mayr, G., Albrecht, M., Rohde, K., Schulz, H., Wahn, U., Hubner, N., & Lee, Y.-A. (2007). Variants in a Novel Epidermal Collagen Gene (COL29A1) Are Associated with Atopic Dermatitis. *PLOS Biology*, 5(9), 1–10.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050242>
- Sorushanova, A., Delgado, L. M., Wu, Z., Shologu, N., Kshirsagar, A., Raghunath, R., Mullen, A., Bayon, Y., Pandit, A., Raghunath, M., & Zeugolis, D. (2018). The Collagen Suprafamily: From Biosynthesis to Advanced Biomaterial Development. *Advanced Materials (Deerfield Beach, Fla.)*, 31, e1801651.
<https://doi.org/10.1002/adma.201801651>
- Susanti, E., Novitasari, S. D., Masita, R., Wardani, H. E., & Wahab, R. A. (2022). Characterization of crude extract of protease from *Bacillus megaterium* TR-10 as efforts to support halal collagen production process from waste fish. *Reinforcement of the Halal Industry for Global Integration Revival*, 17–23.
<https://doi.org/10.1201/9781003324492>
- Tanaka, T., Wakabayashi, T., Oizumi, H., Nishio, S., Sato, T., Harada, A., Fujii, D., Matsuo, Y., Hashimoto, T., & Iwatsubo, T. (2014). CLAC-P/Collagen Type XXV Is Required for the Intramuscular Innervation of Motoneurons during Neuromuscular Development. *Journal of Neuroscience*, 34(4), 1370–1379.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2440-13.2014>
- Utarti, E., Nurita, L., & Arimurti, S. (2025). Screening, Identification, and Optimization of Protease Producing *Bacillus pumilus* Strain DT-15 From Tannery Waste Disposal Site in Addis Ababa, Ethiopia. *International Journal of Microbiology*, 2025(1).
<https://doi.org/10.1155/ijm/7176092>
- Utarti, E., Nurita, L., Arimurti, S., Biologi, J., & Universitas, F. (2009). *Karakterisasi Protease Ekstrak Kasar Bacillus sp 31 Characterization of Crude Protease Bacillus sp 31*. 102–108.
- Voet, D., & Voet, J. G. (2010). *Biochemistry* (4th ed.). John Wiley & Sons.
- Wahyuningsih, R., Andi Febrisiantosa, Teguh Wahyono, Ahmad Iskandar Setiyawan, Diah Pratiwi, Mohammad Faiz Karimy, Taufik Kurniawan, Ragil Yuliatmo, Yuny Erwanto, & Abdul Rohman. (2023). Nutrien dan Morfologi Membran Kerabang Telur Ayam Kampung sebagai Bahan Baku Produksi Kolagen. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*, 29(1), 155–161. <https://doi.org/10.18343/jipi.29.1.155>
- Weber, K., & Osborn, M. (1969). The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Journal of Biological*

- Chemistry*, 244(16), 4406–4412. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)94333-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)94333-4)
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 697–703. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>
- Wenstrup, R. J., Florer, J. B., Brunskill, E. W., Bell, S. M., Chervoneva, I., & Birk, D. E. (2004). Type V collagen controls the initiation of collagen fibril assembly. *Journal of Biological Chemistry*, 279(51), 53331–53337. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409622200>
- Whitaker, J. R. (1994). Principles of enzymology for the food sciences. In Routledge. (Ed.), *Etika Jurnalisme Pada Koran Kuning : Sebuah Studi Mengenai Koran Lampu Hijau* (2nd Editio, Vol. 16, Issue 2).
- Wu, Q., Li, C., Li, C., Chen, H., & Shuliang, L. (2010). Purification and Characterization of a Novel Collagenase from *Bacillus pumilus* Col-J. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160(1), 129–139. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8673-1>
- Zalila-Kolsi, I., Ben-Mahmoud, A., & Al-Barazie, R. (2023). *Bacillus amyloliquefaciens*: Harnessing Its Potential for Industrial, Medical, and Agricultural Applications—A Comprehensive Review. *Microorganisms*, 11(9). <https://doi.org/10.3390/microorganisms11092215>
- Zhang, Y., Fu, Y., Zhou, S., Kang, L., & Li, C. (2013). A straightforward ninhydrin-based method for collagenase activity and inhibitor screening of collagenase using spectrophotometry. *Analytical Biochemistry*, 437(1), 46–48. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ab.2013.02.030>
- Zhu, Y., Wang, L., Zheng, K., Liu, P., Li, W., Lin, J., Liu, W., Shan, S., Sun, L., & Zhang, H. (2022). Optimized Recombinant Expression and Characterization of Collagenase in *Bacillus subtilis* WB600. *Fermentation*, 8(9). <https://doi.org/10.3390/fermentation8090449>