

3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Bahan

Penelitian ini dilaksanakan dengan beberapa prosedur meliputi kultur khamir laut, pembuatan hidrolisat protein kerang, uji proksimat, uji total asam amino. Bahan baku dalam penelitian ini menggunakan kerang hijau (*Perna viridis*) yang diperoleh dari perairan laut Desa Banyu Urip Kecamatan Ujung Pangkah Kabupaten Gresik. Pada kultur khamir laut digunakan bahan yaitu air laut, stok khamir laut, pupuk daun, aquadest dan gula pasir. Pada pembuatan hidrolisat protein diperlukan bahan yaitu kerang hijau, molase dan khamir laut. Untuk analisa proksimat digunakan bahan yaitu kertas saring, kertas label, *silica gel*, *petroleum eter*, H_2SO_4 borax, NaOH, tablet kjeldhal, aquadest, indikator metyl orange. Untuk analisa Total Asam Amino digunakan kertas saring whatman, asam borat, akuades, larutan o-phthaldehyde (OPA), methanol dan merkaptotetanol.

3.1.2 Alat

Peralatan untuk kultur khamir laut meliputi kompor gas, botol kaca, sendok plastik, gelas ukur 100 mL, erlenmeyer 250 mL, tabung reaksi, rak tabung reaksi, spatula, pipet volume, bola hisap, timbangan digital, selang, aerator, gunting, panci, botol *spray*, bunsen, *crushable tank*. Dalam pembuatan hidrolisat protein kerang diperlukan blender, timbangan digital, *beaker glass*, spatula, pipet volume, bola hisap, corong, selang, pipa dan blower. Untuk analisa proksimat alat yang digunakan yaitu, botol timbang, erlenmeyer, gelas ukur, cawan porselen, labu kjeldahl, destruksi, destilasi, buret, statif, gelas piala, *sample tube*, *chrushable tank*, desikator, kompor listrik, timbangan analitik,

timbangan digital, oven, *goldfisch* dan *muffle*. Untuk analisis pH, buih dan emulsi alat yang digunakan diantaranya *cuvet*, *vortex mixer*, pipet volume, pH meter, *beaker glass*, dan *sentrifuge*. Selanjutnya untuk uji Total Asam Amino diperlukan alat-alat meliputi *waterbath*, *stirrer*, pipet volume, bola hisap, mikro pipet, blender, *beaker glass*, timbangan digital, sendok, oven, sentrifuge suhu ruang, falcon, HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), *vortex*.

3.2 Metode Penelitian

3.2.1 Metode

Metode yang dipakai dalam penelitian ini adalah metode eksploratif. Metode ini bersifat kreatif, berpikiran terbuka, fleksibel, serta mampu mengembangkan bakat investigasi dan mampu mengeksplorasi berbagai sumber (Panji, 2011). Gambaran penelitian ini yaitu untuk mengetahui kemampuan dari khamir laut dalam menghidrolisis protein kerang hijau dengan molase sebagai sumber karbon. Penelitian ini dilakukan dengan cara menumbuhkan atau mengkultur khamir laut untuk mendapatkan waktu saat khamir laut berkembang biak dengan cepat (fase logaritmik). Selanjutnya pada penelitian inti yaitu dilakukan pembuatan hidrolisat protein kerang hijau (*Perna viridis*) dengan khamir laut sebagai starternya. Hidrolisat protein kerang hijau selanjutnya akan dilakukan pengujian kualitas produk hidrolisat protein kerang hijau meliputi analisa proksimat, pH, emulsi, daya buih dan total asam amino.

3.2.2 Variabel

Menurut Surakhmad (1994), terdapat dua macam variabel dalam penelitian, yaitu variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas yaitu variabel yang diselidiki pengaruhnya, sedangkan variabel terikat adalah variabel yang diperkirakan akan muncul sebagai pengaruh dari variabel bebas. Variabel bebas

penelitian ini adalah untuk mengetahui kemampuan khamir laut menghidrolisis daging kerang hijau dengan penambahan molase 100 mL, 200 mL, 300 mL dan 400 mL, serta lama fermentasi yang diberikan yaitu 0 hari, 3 hari, 6 hari, 9 hari dan 12 hari. Untuk variabel terkontrol pada penelitian ini yaitu pemberian inokulum khamir laut sebanyak 20 mL pada semua perlakuan. Sedangkan variabel terikat adalah yang menjadi inti penelitian yaitu hasil analisa kualitas produk hidrolisat protein kerang meliputi komposisi kimia (kandungan kadar protein, kadar lemak, kadar air, kadar abu dan kadar karbohidrat), pH, buih, emulsi dan total asam amino.

Pada penelitian ini menggunakan model Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan dua faktor yaitu volume molase 100 mL, 200 mL, 300 mL, 400 mL dan waktu fermentasi ialah 0 hari, 3 hari, 6 hari, 9 hari, 12 hari dengan 3 kali ulangan.

Metode analisa yang digunakan adalah sidik ragam yang mengikuti model sebagai berikut :

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + \epsilon_{ijk}$$

Keterangan:

- Y_{ijk} = Hasil pengamatan untuk faktor A level ke-i faktor B level ke-j, pada ulangan ke-k
 μ = Rataan umum
 a_i = Pengaruh faktor A pada level ke-i (100 mL, 200 mL, 300 mL dan 400 mL)
 β_j = Pengaruh faktor B pada level ke-j (0, 3, 6, 9 dan 12 hari)
 ϵ_{ijk} = Galat percobaan untuk faktor A level ke-i, faktor B level ke-j pada ulangan/kelompok ke-k

Data yang diperoleh selanjutnya dilakukan analisis ragam dan apabila hasilnya berbeda nyata atau sangat nyata maka akan dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) 5% untuk mengetahui perlakuan yang terbaik. Tabel pengamatan perlakuan kombinasi faktor A dan B ada pada tabel 2 dan desain rancangan percobaan dapat dilihat pada tabel 3 berikut.

Tabel 3. Perlakuan Faktor A dan B

Faktor A	Faktor B				
	B1	B2	B3	B4	B5
A1	A1B1	A1B2	A1B3	A1B4	A1B5
A2	A2B1	A2B2	A2B3	A2B4	A2B5
A3	A3B1	A3B2	A3B3	A3B4	A3B5
A4	A4B1	A4B2	A4B3	A4B4	A4B5

Keterangan:

- Faktor A = Molase Segar
- Faktor B = Waktu Fermentasi
- A1 = Molase Segar 100 mL
- A2 = Molase Segar 200 mL
- A3 = Molase Segar 300 mL
- A4 = Molase Segar 400 mL
- B1 = Fermentasi hari ke-0
- B2 = Fermentasi hari ke-3
- B3 = Fermentasi hari ke-6
- B4 = Fermentasi hari ke-9
- B5 = Fermentasi hari ke-12

Tabel 4. Desain Rancangan Percobaan

Perlakuan	Ulangan			Total	Rata - Rata
	I	II	III		
A1B1					
A1B2					
A1B3					
dst...					
Jumlah					

Parameter analisa rancangan percobaan ialah penghitungan hasil seluruh uji yang dilakukan dalam penelitian ini. Dari hasil penghitungan kemudian data-data tersebut akan dianalisa menggunakan model analisa sidik ragam.

3.3 Prosedur Kerja

3.3.1 Penetapan Fase Log Khamir Laut (Sukoso, 2012)

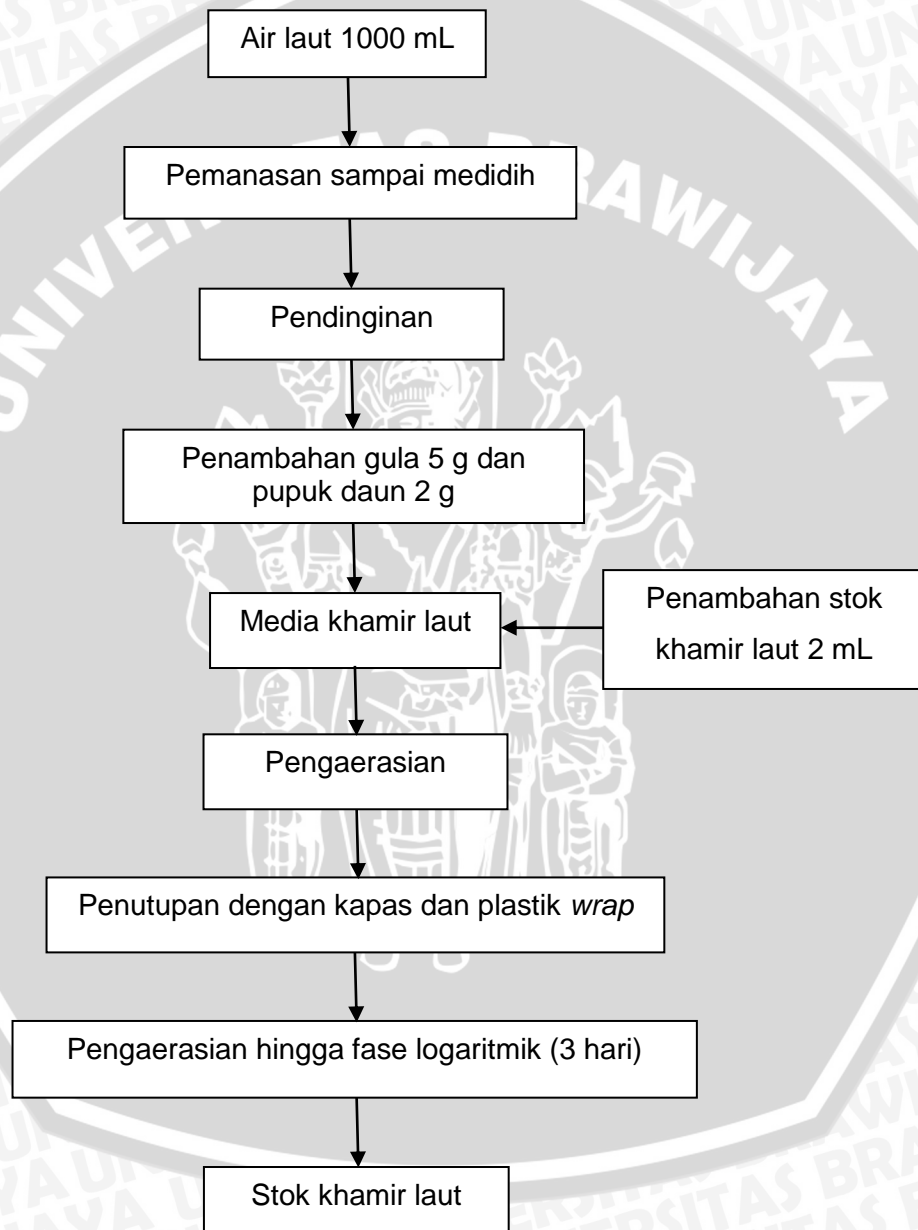
Cara mengkultur khamir laut memerlukan persiapan sebagai berikut:

- Sterilkan air laut dengan pemanasan sampai mendidih (± 1 jam) kemudian dinginkan pada suhu kamar
- Air laut steril sebanyak 1000 mL yang telah dingin masukkan kedalam *beaker glass*. Tambahkan gula pasir 5 g sebagai sumber nutrisi dan pupuk daun 2 g sebagai sumber nitrogen. Homogenkan media kultur dan masukkan botol kaca steril sebagai media khamir laut.
- Dalam media khamir laut masukkan stok khamir laut sebanyak 2 mL lalu homogenkan.
- Pengaerasian selama 5 hari untuk pengamatan tingkat kekeruhan dan kepadatan sel khamir laut.
- Tutup botol media kultur menggunakan kapas dan plastik *warp* untuk menghindari kontaminasi yang tidak diinginkan.

Pengamatan tingkat kepadatan khamir laut dilakukan setiap 12 jam sampai hari ke-empat menggunakan mikroskop. Kultur khamir laut yang telah diaerasi ambil sebanyak 1 mL untuk pengenceran dari 10^{-1} sampai 10^{-4} . Adapun langkah-langkah yang dilakukan untuk pengenceran kultur khamir laut adalah sebagai berikut :

- Media khamir laut setiap 9 mL dimasukkan pada empat tabung reaksi untuk dilakukan pengenceran 10^{-1} sampai 10^{-4} . Pada tabung reaksi 10^{-1} dimasukkan kultur khamir laut sebanyak 1 mL, selanjutnya homogenkan dengan menggunakan *vortex mixer*.

- Pengambilan 1 ml dari pengenceran 10^{-1} lalu masukkan kedalam tabung reaksi kedua sebagai pengenceran 10^{-2} kemudian homogenkan, dan seterusnya sampai pengenceran 10^{-4} .
- Uji masing-masing hasil pengenceran dari 10^{-1} sampai 10^{-4} untuk mengetahui kepadatan sel khamir laut menggunakan mikroskop *haemocytometer*.



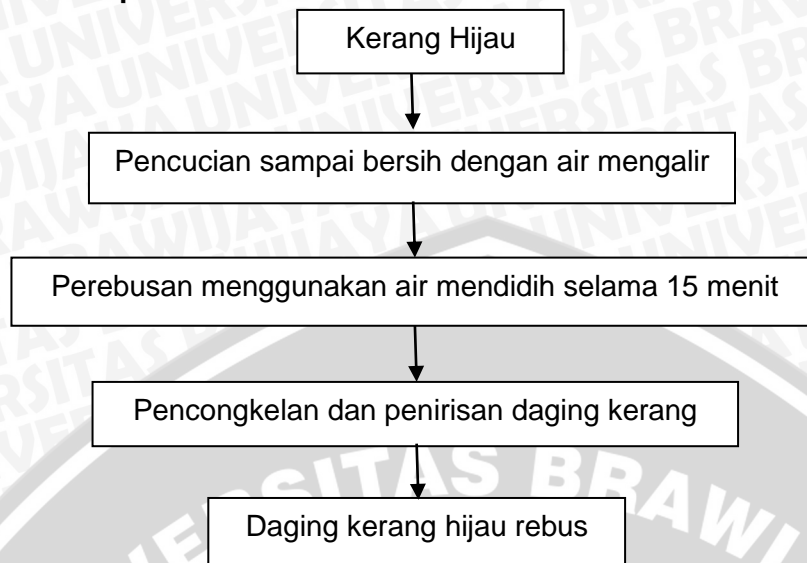
Gambar 3. *Flow chart* Kultur Khamir Laut (Sukoso, 2012).

3.3.2 Pembuatan Hidrolisat Protein Kerang Hijau Rebus

Pembuatan hidrolisat protein dari daging kerang hijau rebus memerlukan persiapan bahan baku yaitu dengan mencuci kerang menggunakan air bersih untuk selanjutnya direbus sebagai perlakuan sampel dan menjadikan tekstur daging kerang menjadi lebih sederhana. Haluskan daging kerang hijau menggunakan *chopper* agar permukaan daging merata sehingga mudah homogen dengan komponen bahan-bahan yang lain.

Penambahan molase dengan volume yang berbeda yaitu 100 mL, 200 mL, 300 mL, 400 mL untuk mengetahui tingkat pengaruh molase dalam pembuatan hidrolisat protein kerang hijau rebus dengan inokulan khamir laut sebanyak 20 mL dari hasil penentuan fase logaritmiknya. Selanjutnya fermentasi dalam botol plastik secara aerob selama 12 hari dengan pengamatan pada 0 hari, 3 hari, 6 hari, 9 hari dan 12 hari. Adapun tujuan lama fermentasi yang berbeda adalah untuk mengetahui waktu optimal fermentasi khamir laut dalam proses pembuatan hidrolisat protein. Penyaringan hidrolisat menggunakan kain blacu untuk memisahkan antara cairan (hidrolisat) dan endapan (residu). Kemudian adalah pengeringan cairan hidrolisat pada oven vacum selama \pm 15 jam dengan suhu 55 °C agar tidak merusak kandungan proteinnya dan menginaktifkan khamir laut. Setelah itu cairan hidrolisat akan berubah menjadi bentuk pasta akibat kadar air dalam produk cair pekat hidrolisat menguap dengan keadaan vakum bertekanan tinggi. Analisis produk hasil meliputi analisa prosimat, pH, daya buih, daya emulsi. Hasil kadar protein tertinggi dari setiap perlakuan dilakukan analisa total asam amino menggunakan metode HPLC.

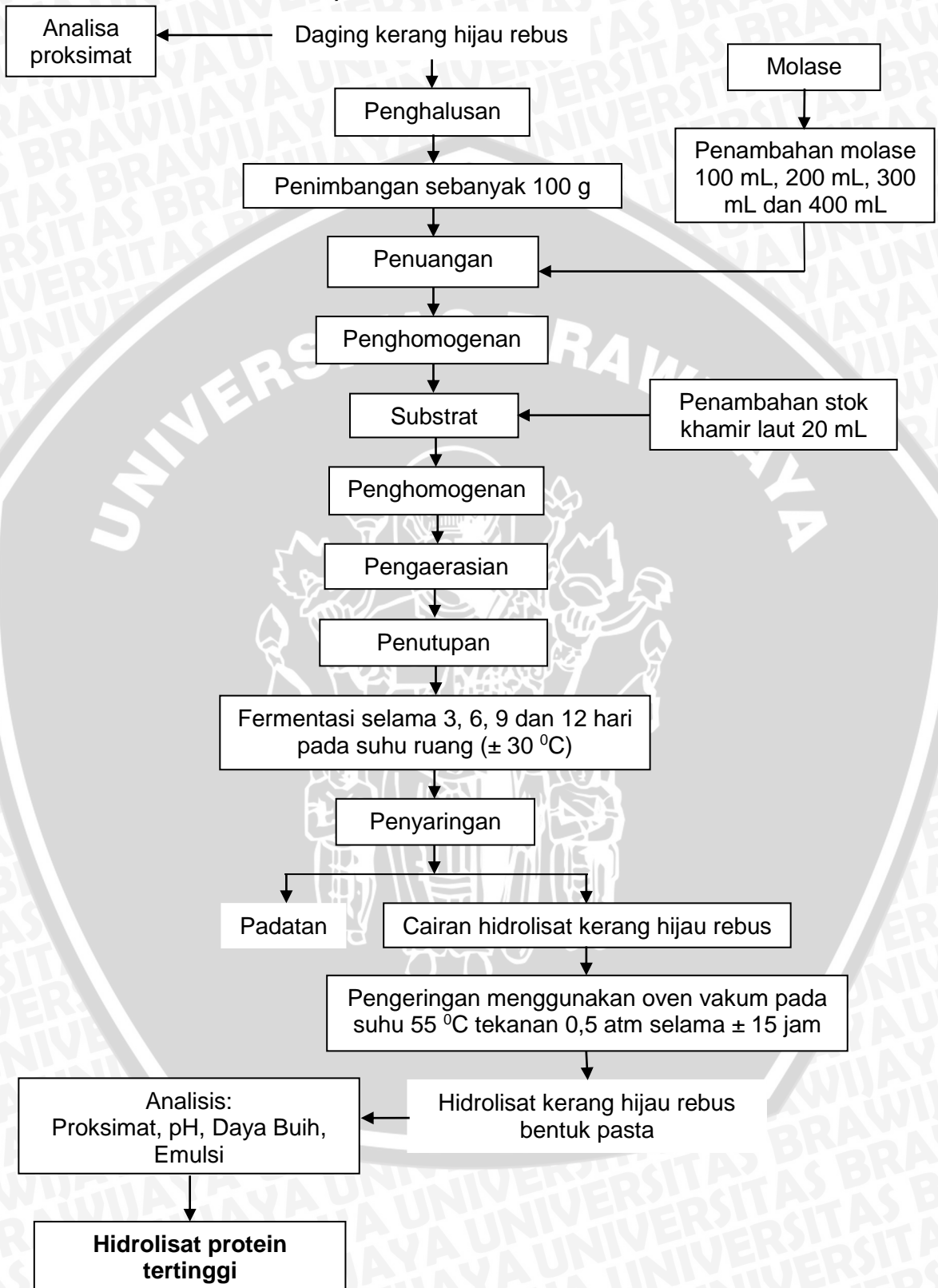
Preparasi sampel



Gambar 4. Flow chart perebusan kerang hijau



Pembuatan Hidrolisat Protein Kerang Hijau Rebus (dimodifikasi dari Bueno et al., 2008 dan Jannah, 2012)



Gambar 5. Flow chart Hidrolisat Protein Kerang Hijau Rebus

3.4 Parameter Uji

3.4.1 Analisa Proksimat

- **Kadar Air (Andarwulan *et al.*, 2011)**

Metode analisa kadar air adalah dengan menggunakan metode pengeringan atau pengovenan. Prinsipnya yaitu mengeringkan sampel dalam oven pada suhu 100 °C – 105 °C hingga diperoleh berat konstan. Metode ini dilakukan dengan cara mengeluarkan air dari bahan akibat proses pemanasan.

Prosedur kerja analisa kadar air adalah sebagai berikut:

- Preparasi alat yaitu cawan kosong beserta tutupnya keringkan dalam oven selama 15 menit dengan suhu 105 °C.
- Cawan kosong beserta tutupnya masukkan dalam desikator selama 10 menit bertujuan untuk menyerap uap air.
- Timbang cawan kosong beserta tutupnya menggunakan timbangan digital lalu dicatat sebagai berat A.
- Timbang sampel sebanyak 5 g dan catat sebagai berat B.
- Masukkan sampel dalam cawan yang telah dioven sebelumnya.
- Cawan yang berisi sampel dioven dengan suhu 105 °C selama 3 jam.
- Cawan yang berisi sampel pindahkan kedalam desikator dan tunggu selama 10 menit.
- Ditimbang cawan yang berisi sampel dan dicatat sebagai berat C.
- Dihitung kadar air sesuai dengan rumus % kadar air sebagai berikut:

$$\% \text{ Kadar air (basis kering)} = \frac{b-(c-a)}{(c-a)}$$

dimana :
a = berat cawan kering yang sudah konstan
b = berat sampel awal
c = berat cawan dan sampel kering yang sudah konstan

- **Kadar Lemak (Sudarmadji et al., 2003)**

Lemak adalah bagian terpenting dari semua bahan, lemak berperan dalam penambah kalori dan memperbaiki tekstur dan citarasa bahan pangan (Winarno, 2003). Adapun metode analisa kadar lemak adalah dengan menggunakan metode *goldfish* yaitu sampel yang sudah halus sebanyak 2 g dimasukkan dalam thimble dan pasang dalam tabung penyangga yang pada bagian bawahnya berlubang. Masukkan bahan pelarut pada *beaker glass* lalu pasang dibawah tabung penyangga. Prinsip kerja metode ini yaitu apabila dipanaskan, uap pelarut akan naik dan didinginkan oleh kondensor sehingga uap akan mengembun dan menetes pada sampel, demikian terus menerus sehingga bahan atau sampel akan dibasahi oleh pelarut dan lipid akan terekstraksi seterusnya akan tertampung pada beaker glass kembali. Setelah dipanaskan 3 – 4 jam, pemanas dimatikan, lalu diulang hal yang sama tetapi pelarut diganti dengan yang baru. Selanjutnya residu dioven dalam 100 °C sampai berat konstan. Berat residu ini dinyatakan sebagai minyak atau lemak yang terkandung dalam bahan pangan. Dihitung kadar lemaknya menggunakan rumus berikut:

$$\% \text{ kadar lemak} = \frac{\{(a+b)-c\}}{a} \times 100\%$$

keterangan: a = berat awal (g)
b = berat kertas saring (g)
c = berat akhir (g)

- **Kadar Abu (AOAC, 2005)**

Analisis kadar abu yaitu dengan mengabukan sampel dalam tanur. Tahap pertama adalah preparasi cawan porselen dengan pengeringan dalam oven selama 1 jam dengan suhu 105 °C lalu dinginkan dalam desikator selma 15 menit kemudian ditimbang. Sampel sebanyak 5 g masukkan dalam cawan pengabuan kemudian bakar diatas kompor listrik hingga tidak keluar asap lagi.

Setelah itu masukkan cawan kedalam tanur pengabuan dengan suhu 600 °C selama 6 jam. Timbang cawan hingga berat konstan. Proses pengabuan dilakukan hingga abu berwarna putih. Setelah itu dinginkan cawan dalam desikator selama 30 menit, kemudian timbang bobotnya.

Perhitungan kadar abu:

$$\% \text{ kadar abu} = \frac{C-A}{B-A} \times 100\%$$

Keterangan: A = Berat cawan kosong (g)
B = Berat cawan yang diisi sampel (g) sebelum ditanur
C = Berat cawan dengan sampel (g) setelah ditanur

- **Kadar Protein (AOAC, 2005)**

Protein menjadi komponen yang sangat penting karena sebagian besar dibutuhkan jaringan tubuh, protein adalah komponen terbesar setelah air. Protein juga merupakan sumber asam amino yang mengandung unsur C, H, O, dan N yang tidak dimiliki oleh lemak dan karbohidrat (Winarno, 2003).

Prinsip analisis protein yaitu untuk mengetahui kandungan protein kasar (*crude protein*) dari suatu bahan. Prosedur yang dilakukan dalam analisis protein terdiri dari tiga tahap, yaitu destruksi, destilasi dan titrasi. Pengukuran kadar protein dilakukan dengan metode mikro Kjeldahl. Sampel ditimbang sebanyak 0,25 g, masukkan dalam labu Kjeldahl 100 mL, lalu tambahkan 0,25 g selenium dan 3 mL H₂SO₄ pekat. Destruksi pada suhu 410 °C selama ±1 jam sampai larutan jernih lalu dinginkan. Setelah dingin dalam labu Kjeldahl tambahkan 50 mL akuades dan 20 mL NaOH 40%. Lakukan proses destilasi dengan suhu destilator 100 °C. Hasil destilasi ditampung dalam labu Erlenmeyer 125 mL yang berisi campuran 10 mL asam borat (H₃BO₃) 2% dan 2 tetes indikator *bromcherosol green-methyl red* yang berwarna merah muda. Apabila volume destilat telah mencapai 40 mL dan berwarna hijau kebiruan, maka proses

destilasi dihentikan. Selanjutnya titrasi hasil destilat dengan HCl 0,1 N hingga terjadi perubahan warna merah muda. Volume titran dibaca dan dicatat. Larutan blanko dianalisis seperti contoh.

Kadar protein dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\% N = \frac{(\text{mL HCL}-\text{mL blanko}) \times N \text{ HCl} \times 14,007 \times \text{fp}}{\text{mg contoh} \times \text{faktor koreksi alat}^*} \times 100\%$$

*) Faktor koreksi alat = 2,5

% Kadar protein = % N x faktor konversi *

*) Faktor Konversi = 6,25

- **Kadar Karbohidrat (Andarwulan *et al.*, 2011)**

Metode analisa karbohidrat yaitu biasa menggunakan karbohidrat *by difference*. Komponen karbohidrat diperoleh dari hasil pengurangan angka 100 dengan prosentase komponen lain (air, abu, lemak dan protein). Apabila hasil pengurangan ini dikurangi dengan prosentase serat, maka akan diperoleh kadar karbohidrat yang dapat dicerna oleh tubuh.

$$\% \text{Kadar karbohidrat} = 100\% - (\text{kadar air} + \text{lemak} + \text{protein})\%$$

3.4.2 Uji pH (SNI 06-6989.11-2004)

Nilai keasaman atau pH sangat dipengaruhi jumlah asam-asam organik yang dihasilkan oleh proses fermentasi sumber karbon pada media fermentasi. Apabila aktivitas dari mikroba meningkat maka akan menyebabkan tingkat keasaman yang diproduksi juga meningkat, sehingga nilai pH produk akan semakin rendah. Prosedur dalam pengukuran pH yaitu pertama elektroda keringkan dengan tisu dan bilas dengan air suling. Celupkan elektroda dalam contoh uji sampai pembacaan konstan oleh pH meter. Catat hasil pembacaan angka pada tampilan dari pH meter.

3.4.3 Uji Buih (Rieuwpassa *et al.*, 2013)

Prosedur analisa daya buih yaitu sampel sebanyak 1 g tambahkan 10 mL air dan homogenisasi selama 1 menit. Amati kapasitas busa yang terbentuk dan hitung kapasitas busanya dibandingkan dengan kapasitas volume awal.

$$\text{Kapasitas busa} = \frac{\text{volume busa yang terbentuk}}{\text{volume awal}} \times 100\%$$

3.4.4 Uji Emulsi (Rieuwpassa *et al.*, 2013)

Prosedur analisa emulsifikasi yaitu sampel sebanyak 5 g masukkan kedalam cuvet kemudian tambahkan 20 mL air dan 20 mL minyak jagung. Homogenisasi larutan selama 1 menit lalu disentrifus pada 7500 rpm selama 5 menit. Kapasitas emulsi dihitung menggunakan rumus.

$$\text{Kapasitas emulsi} = \frac{\text{volume emulsi setelah disentrifus}}{\text{volume awal}} \times 100\%$$

3.4.5 Uji Total Asam Amino (dimodifikasi dari AOAC 2005)

Analisis asam amino ditentukan dengan menggunakan HPLC. Prinsip kerja HPLC ialah menggunakan kromatografi yaitu merupakan suatu metode pemisahan yang mengacu pada perbedaan migrasi komponen-komponen antara dua fase yaitu fase diam dan fase gerak. Sebelum digunakan perangkat HPLC harus dipreparasi dibilas dulu dengan eluen yang akan digunakan selama 2-3 jam. *Syringe* yang akan digunakan juga harus dibilas dengan akuades. Analisis asam amino dengan menggunakan HPLC terdiri atas 4 tahap, yaitu tahap pembuatan hidrolisat protein, tahap pengeringan, tahap derivatisasi dan tahap injeksi serta analisis asam amino.

1. Tahap pembuatan hidrolisat protein

Hal yang dilakukan pada tahap pembuatan hidrolisat protein yaitu sampel ditimbang sebanyak 3 mg dan dihaluskan. Sampel yang halus dihidrolisis asam

menggunakan HCl 6 N sebanyak 1 mL yang kemudian dipanaskan dalam oven pada suhu 110 °C selama 24 jam bertujuan untuk menghilangkan gas atau udara yang ada pada sampel supaya tidak mengganggu kromatogram yang dihasilkan.

Selain itu, pemanasan dilakukan untuk mempercepat reaksi hidrolisis

2. Tahap pengeringan

Sampel yang telah dihidrolisis pada suhu kamar dipindahkan isinya ke dalam labu evaporator 50 mL, dibilas dengan 2 mL HCl 0,01 N dan cairan bilasan dimasukkan dalam labu evaporator. Proses ini diulangi hingga 2-3 kali. Selanjutnya sampel dikeringkan menggunakan *rotary evaporator* selama 15-30 menit untuk mengubah sistein menjadi sistin. Sampel yang sudah kering ditambahkan 5 mL HCl 0,01 N kemudian disaring dengan kertas saring millipore.

3. Tahap derivatisasi

Dilakukan pembuatan larutan derivatisasi dengan penambahan buffer kalium borat pH 10,4 pada sampel dengan perbandingan 1:1. Kemudian vial kosong yang bersih masukkan 50 µL sampel dan tambahkan 250 µL pereaksi *Ortoflaaldehida* (OPA) dengan perbandingan 1:5 dibiarkan 1 menit agar derivatisasi berlangsung sempurna. Proses derivatisasi ini dilakukan supaya detektor mudah untuk mendeteksi senyawa yang ada pada sampel. Pembuatan larutan stok OPA dilakukan dengan cara mencampurkan 50 mg OPA kedalam 4 mL metanol dan 0,025 mL merkptoetanol. Dikocok hati-hati dan ditambahkan larutan brij 30% sebanyak 0,050 mL dan buffer kalium borat 1 M, pH 10,4 sebanyak 1 mL. Simpan larutan dalam botol berwarna gelap pada suhu 4 °C sehingga akan dapat stabil selama 2 minggu.

4. Tahap injeksi ke HPLC

Injeksikan pada HPLC sebanyak 5 µL dan ditunggu sampai pemisahan semua asam amino selesai. Waktu yang diperlukan adalah sekitar 25 menit. Untuk perhitungan konsentrasi asam amino yang ada pada bahan, dilakukan

pembuatan kromatogram standar dengan menggunakan asam amino yang telah siap pakai yang mengalami perlakuan yang sama dengan sampel.

Kandungan asam amino dalam 100 g bahan dapat dihitung dengan rumus:

$$\mu\text{mol asam amino} = \frac{\text{luas daerah sampel}}{\text{luas daerah standar}} \times c \times fp$$

Keterangan: C = Konsentrasi standar asam amino (0,5 $\mu\text{mol/mL}$)
fp = faktor pengenceran (5 mL)

$$\% \text{ asam amino} = \frac{\mu\text{mol AA} \times \text{Mr AA}}{\mu\text{g sampel}} \times 100\%$$

Kondisi alat HPLC saat berlangsungnya analisis asam amino sebagai berikut:

Temperatur	: 27 °C (suhu ruang)
Jenis kolom HPLC	: Ultra techspere (Coloum C-18)
Kecepatan alir eluen	: 1 mL/menit
Tekanan	: 3000 psi
Fase gerak	: Buffer Na-Asetat dan methanol 95%
Detektor	: Fluoresensi
Panjang gelombang	: 254 nm