

**KARAKTERISTIK EKSTRAK KASAR KHAMIR LAUT DALAM HIDROLISIS
PROTEIN KEPALA IKAN PEPEREK (*Leiognathus sp.*)**

**LAPUAN SKRIPSI
TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN**

**OLEH :
ANGGRA INDRATWARI
NIM. 0610830010**



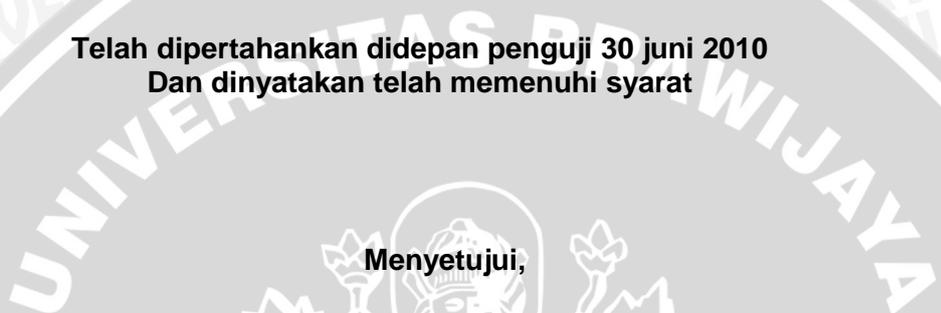
**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2010**

**KARAKTERISTIK EKSTRAK KASAR KHAMIR LAUT DALAM HIDROLISIS
PROTEIN KEPALA IKAN PEPEREK (*Leiognathus* sp.)**

**LAPORAN SKRIPSI
TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN**

Oleh:
ANGGRA INDRATWARI
0610830010

Telah dipertahankan didepan penguji 30 juni 2010
Dan dinyatakan telah memenuhi syarat



Menyetujui,

Dosen Penguji I

Dosen Pembimbing I

Dr. Ir. Hartati K., MS
NIP. 19640604 1990022002
Tanggal:

Prof.Ir. Sukoso, MSc. PhD
NIP. 19640919 198903100
Tanggal:

Dosen Penguji II

Dosen Pembimbing II

Ir. Darius, M.Biotech
19500531 1981031003
Tanggal:

Ir. Muhammad Firdaus, MS
NIP. 19680919 200501 1 001
Tanggal:

Mengetahui,
Ketua Jurusan MSP

Dr. Ir. Happy Nursyam, MS
NIP. 19600322 198601 1 001
Tanggal:



KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Allah SWT yang telah memberi rahmat sehingga penulisan skripsi ini dapat diselesaikan. Penulis menyadari sepenuhnya bahwa laporan ini tidak akan tersusun tanpa bantuan dan dukungan dari berbagai pihak, rasa hormat dan terima kasih kami sampaikan kepada :

1. Prof. Ir. Sukoso, MSc. Ph.D selaku Dosen Pembimbing I, yang telah memberikan pengarahan dan bimbingan sehingga laporan ini dapat tersusun.
2. Ir. Muhamad Firdaus, MS selaku Dosen Pembimbing II, yang telah memberikan pengarahan dan bimbingan sehingga laporan ini dapat tersusun.
3. Laboratorium Kimia Organik Universitas Gajahmada Jogjakarkata, Laboratorium Biomedik Kedokteran , Laboratorium Teknologi Hasil Perikanan (THP) dan Laboratorium Mikrobiologi Dasar Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya-Malang.
4. Semua pihak yang telah memberi bantuan dan dorongan sehingga laporan ini dapat dapat terselesaikan dengan baik.

Semoga ALLAH SWT memberikan balasan yang lebih atas jasa dan kebaikan mereka. Penulis menyadari bahwa dalam laporan ini masih terdapat banyak kekurangan, sehingga adanya kritik dan saran dari pembaca nantinya kami harapkan dapat menambah kesempurnaan laporan ini. Akhirnya, semoga dapat bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan khususnya bagi kami pribadi dan pembaca

Malang, Juli 2010

Penulis

RINGKASAN

ANGGRA INDRATWARI Karakteristik Hidrolisat Protein Kepala Ikan Peperek (*Leiognathus* sp.) dengan Ekstrak Khamir Laut (Dibawah bimbingan Prof. Ir. **SUKOSO, MSc. Ph.D** dan Ir. **MUHAMAD FIRDAUS, MS**)

Hidrolisat protein ikan merupakan produk cairan yang dibuat dari ikan dengan penambahan bahan penghidrolisis berupa asam, basa atau enzim dengan hasil akhir berupa campuran komponen protein. Hidrolisat protein ikan ini kaya akan asam-asam amino esensial yang sangat dibutuhkan oleh tubuh. Memproduksi hidrolisat protein ikan dapat dilakukan dengan berbagai metode yaitu hidrolisis dengan asam, basa dan enzimatis. Hidrolisis protein ikan yang paling efisien dan menguntungkan adalah hidrolisis secara enzimatis karena enzim menghasilkan peptida yang tinggi dan kurang kompleks serta mudah dipecah-pecah. Di samping itu, hidrolisis menggunakan enzim dapat menghasilkan hidrolisat yang terhindar dari perubahan dan penghancuran produk secara hidrolitik.

Protease adalah salah satu enzim yang dapat digunakan untuk hidrolisis protein ikan karena dapat menghidrolisis protein dengan memotong ikatan peptida dan mempercepat sintesis peptida. Keterbatasan kemampuan hewan dan tumbuhan dalam memenuhi permintaan protease, telah mendorong berkembangnya protease mikroorganisme salah satunya khamir (Putranto, 2006).

Ikan peperek terutama bagian kepala kurang dimanfaatkan dan menjadi limbah perikanan. Sampai saat ini pemanfaatannya masih dalam bentuk tepung ikan, dan pakan ternak yang bernilai ekonomis rendah. Alternatif pemanfaatan kepala ikan peperek adalah digunakan sebagai produk hidrolisat protein ikan. Kepala ikan memiliki nilai nutrisi yang cukup baik untuk dimanfaatkan sebagai bahan hidrolisat protein ikan terutama memiliki kandungan proteinnya sebesar 15 gram/100 gram dan asam-asam amino yang cukup baik yaitu tryptophan, threonin, isoleusin, leusin, lysine, methionin, cystin, phenylalanin, tyrosin, valin, arginin, histidin, alanin, asam aspartat, asam glutamat, glisin, prolin, serin, hydroxyprolin. Arnesen and Gildber (2009) menyatakan bahwa kepala ikan cod memiliki *raw material* yang kompleks yaitu terdiri dari otot 45%, daging 12 %, 3 % visceral, tulang 20%, insang 15% , kulit 5 % and mata 4 % dan memiliki nilai rata-rata protein sebesar 15 %.

Khamir laut adalah mikroorganisme bersel tunggal yang telah menunjukkan aktivitasnya sebagai bahan penghidrolisat. Khamir laut dapat memproduksi protease dengan aktivitas yang tinggi yaitu 623,1 U/mg (Chi, *et al.*, 2006). Nilai konstanta Michaelis-Menten (K_m) dan kecepatan maksimal (V_{maks}) pada khamir laut strain 10 *A. Pullulans* dengan menggunakan kasein adalah 0,25 mg/ml dan 0,0286 mmol/min/mg protein dan berat molekul sebesar 32,0 kDa (Ma, *et al.*, 2007). Alkalin protease pada khamir laut dapat digunakan dengan baik untuk hidrolisis protein ikan. Sehingga perlu adanya aplikasi pemanfaatan khamir laut untuk menghidrolisis protein ikan khususnya kepala ikan untuk meningkatkan nilai ekonomi maupun gizi kepala ikan terutama pada ikan peperek.

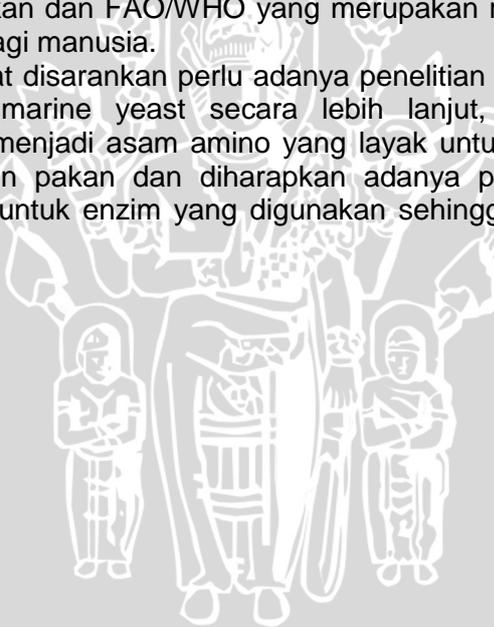
Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui karakteristik protease dari ekstrak khamir laut meliputi aktivitas protease dari khamir laut, konsentrasi protease khamir laut, konstanta Michaelis-Menten (K_m) dan kecepatan maksimal (V_{maks}). Selain itu untuk mengetahui karakteristik hidrolisis kepala ikan

peperok dari ekstrak khamir laut meliputi DH (derajat hidrolisis), berat molekul (SDS PAGE) dan profil asam amino (HPLC).

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksploratif. Metode eksploratif adalah suatu metode yang bertujuan menghimpun informasi awal yang akan membantu upaya menetapkan masalah dan merumuskan hipotesis.). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakteristik protease khamir laut sebagai bahan penghidrolisis hidrolisat protein kepala ikan peperok dan mengetahui karakteristik hidrolisis kepala ikan peperok dari ekstrak khamir laut.

Dari hasil penelitian yang telah dilaksanakan diperoleh hasil yaitu karakteristik protease yang diekstrak dari marine yeast mempunyai konsentrasi 22,17 ppm, aktivitas enzim 0,0215 U/ml, aktivitas spesifik enzim 8,4 U/mg, serta V_{maks} 15,57 mmol L⁻¹ min⁻¹ dan K_m sebesar 7,187 x 10⁻³ mM. Karakteristik hidrolisis protease yang didapat dari ekstrak marine yeast dengan waktu 0, 25, 50, 75 dan 100 menit diperoleh persentase masing-masing DH sebesar 25,5 % ; 32,77 % ; 35,3 % ; 42,06 % dan 44,33 %, mampu memecah peptida menjadi berat molekul berkisar antara 47,63 – 9,48 kDa. Hasil analisa profil asam amino hidrolisat protein kepala ikan peperok terdeteksi sebanyak 12 asam amino yaitu aspartat, glutamat, serin, histidin, glisin, arginin, alanin, valin, fenilalanin, isoleusin, leusin dan lisin. Presentase asam amino yang diperoleh sangat kecil dibandingkan referensi dari NRC yang merupakan referensi kebutuhan asam amino esensial untuk ikan dan FAO/WHO yang merupakan referensi kebutuhan asam amino esensial bagi manusia.

Penelitian ini dapat disarankan perlu adanya penelitian mengenai purifikasi enzim protease dari marine yeast secara lebih lanjut, sehingga mampu menghidrolisis protein menjadi asam amino yang layak untuk digunakan dalam bidang pangan maupun pakan dan diharapkan adanya penelitian mengenai optimasi pH dan suhu untuk enzim yang digunakan sehingga kerja enzim bisa optimal.



DAFTAR ISI

| | Halaman |
|--|-----------|
| HALAMAN JUDUL..... | i |
| LEMBAR PENGESAHAN | ii |
| KATA PENGANTAR | iii |
| RINGKASAN..... | iv |
| DAFTAR ISI | vi |
| DAFTAR GAMBAR..... | viii |
| DAFTAR TABEL..... | ix |
| DAFTAR LAMPIRAN | x |
| 1. PENDAHULUAN | 1 |
| 1.1 Latar Belakang | 1 |
| 1.2 Identifikasi Masalah..... | 6 |
| 1.3 Tujuan Penelitian | 7 |
| 1.4 Kegunaan Penelitian | 8 |
| 1.5 Tempat dan Waktu Penelitian | 8 |
| 2. TINJAUAN PUSTAKA | 9 |
| 2.1 Protease..... | 9 |
| 2.2 Khamir Laut..... | 11 |
| 2.3 Hidrolisat Protein Ikan | 13 |
| 2.4 Hidrolisis..... | 16 |
| 2.4.1 Macam-macam Hidrolisis..... | 17 |
| 3. MATERI DAN METODE PENELITIAN | 19 |
| 3.1 Materi Penelitian..... | 19 |
| 3.1.1 Bahan Penelitian | 19 |
| 3.1.2 Alat Penelitian | 19 |
| 3.2 Metode Penelitian | 19 |
| 3.3 Prosedur Penelitian | 20 |
| 3.3.1 Penelitian Pendahuluan..... | 20 |
| 3.3.2 Penelitian Inti | 25 |
| 4. HASIL DAN PEMBAHASAN..... | 35 |
| 4.1 Karakteristik Protease Ekstrak Khamir Laut..... | 35 |
| 4.1.1 Konsentrasi Protease Ekstrak Khamir Laut | 35 |
| 4.1.2 Aktivitas Protease Ekstrak Khamir Laut..... | 35 |
| 4.1.3 Penentuan V_{maks} dan K_m | 36 |
| 4.2 Karakteristik Hidrolisis Kepala Ikan Peperek | 38 |
| 4.2.1 Derajat Hidrolisis | 38 |
| 4.2.2 Analisa Berat Molekul (SDS PAGE) | 41 |
| 4.2.3 Profil Asam Amino (HPLC) | 43 |



| | |
|-----------------------------|-----------|
| 5. PENUTUP | 47 |
| 5.1 Kesimpulan | 47 |
| 5.2 Saran | 47 |
| DAFTAR PUSTAKA | 49 |
| LAMPIRAN | 53 |



DAFTAR GAMBAR

| Gambar | Halaman |
|--|---------|
| 1. Reaksi Hidrolisis Protein | 16 |
| 2. Ikan Peperek (<i>Leiognathus</i> sp.) | 26 |
| 3. Prosedur Hidrolisis Kepala Protein Ikan Peperek | 27 |
| 4. Prosedur Analisa Derajat Hidrolisis | 28 |
| 5. Rangkaian Alat SS PAGE | 32 |
| 6. Grafik V_{maks} dan K_m | 37 |
| 7. Profil Berat Molekul | 42 |
| 8. Profil Asam Amino | 43 |



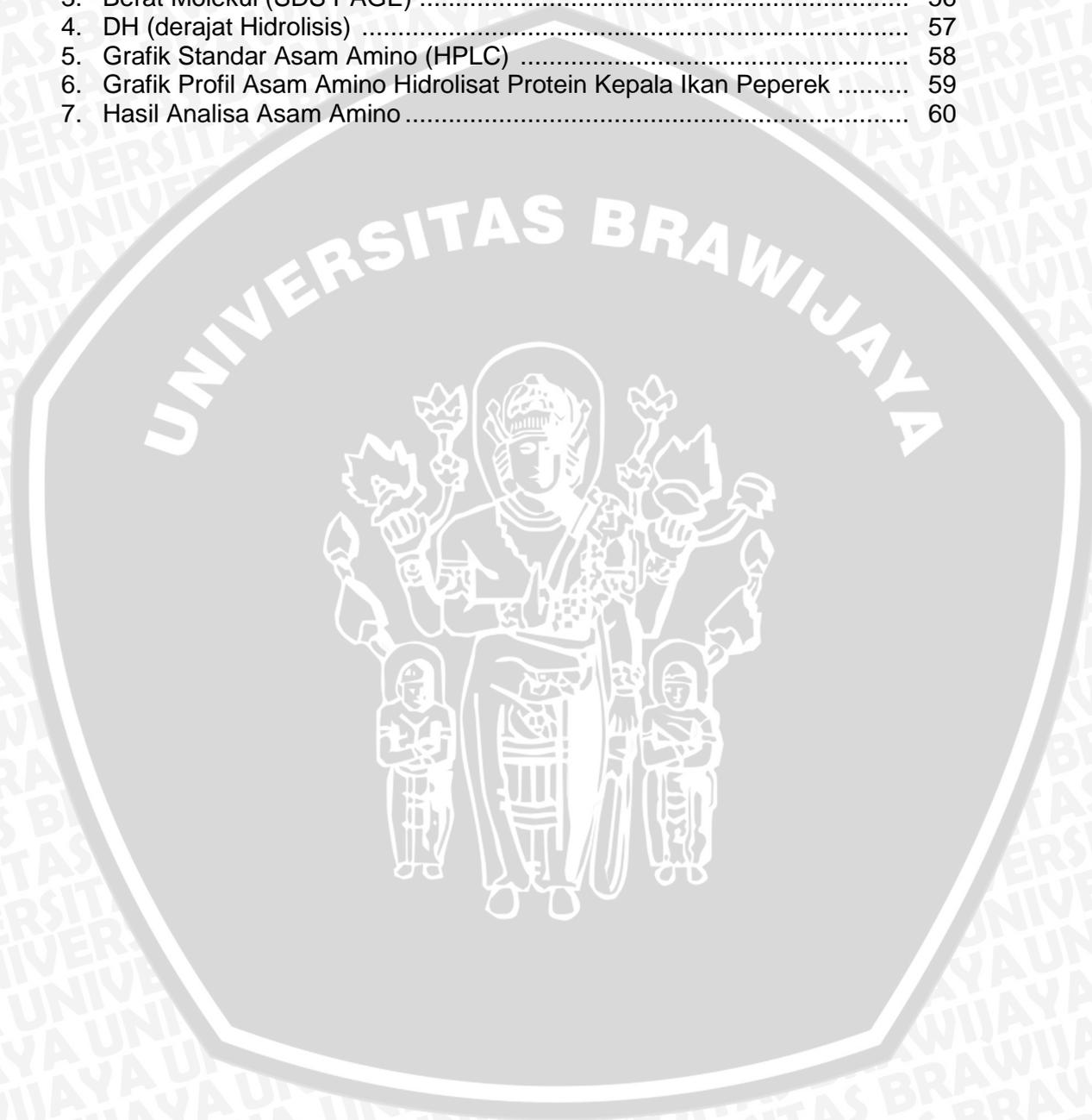
DAFTAR TABEL

| Tabel | Halaman |
|---|---------|
| 1. Karakteristik Alkalin Protease..... | 13 |
| 2. Skema Kerja Uji Aktivitas Protease Ekstrak Khamir Laut | 21 |
| 3. Karakteristik Protease Ekstrak Khamir Laut | 35 |
| 4. Karakteristik Hidrolisis Kepala Ikan Peperek..... | 38 |
| 5. Profil Asam Amino pada Hidrolisat Protein Kepala Ikan Peperek..... | 44 |
| 6. Kandungan Asam Amino Hidrolisat Kepala Ikan Hering..... | 45 |



DAFTAR LAMPIRAN

| Lampiran | Halaman |
|--|---------|
| 1. Perhitungan Konsentrasi Protein Sampel dengan Spektrofotometer | 53 |
| 2. Perhitungan V_{maks} dan K_m | 54 |
| 3. Berat Molekul (SDS PAGE) | 56 |
| 4. DH (derajat Hidrolisis) | 57 |
| 5. Grafik Standar Asam Amino (HPLC) | 58 |
| 6. Grafik Profil Asam Amino Hidrolisat Protein Kepala Ikan Peperek | 59 |
| 7. Hasil Analisa Asam Amino | 60 |



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Enzim merupakan senyawa berstruktur protein yang dapat berfungsi sebagai katalisator dan dikenal sebagai biokatalisator. Enzim berperan sebagai katalisator yang mengkatalisis reaksi-reaksi kimia yang terjadi dalam sistem biologis. Molekul-molekul enzim merupakan katalis yang sangat efisien dalam mempercepat perubahan substrat menjadi produk-produk akhir. Enzim biasanya sangat spesifik terhadap reaksi yang ia kataliskan maupun terhadap substrat yang terlibat dalam reaksi.

Enzim yang memiliki daya katalitik yang spesifik dan efisien terhadap ikatan peptida dari suatu polipeptida atau protein disebut sebagai enzim proteolitik atau protease. Protease merupakan enzim yang sangat penting dalam industri pangan maupun non pangan. Pemanfaatan protease dalam industri pangan diantaranya adalah untuk mengurangi kekeruhan dalam industri bir, mengurangi gluten pada industri roti, untuk menggumpalkan susu pada industri keju dan sebagai bahan penghidrolisis. Enzim protease dapat diperoleh dari jaringan tanaman, hewan, maupun mikroba. Keterbatasan kemampuan hewan dan tumbuhan dalam memenuhi permintaan protease, telah mendorong berkembangnya protease mikroorganisme salah satunya khamir (Putranto, 2006). Oleh karena itu, tidak mengherankan apabila protease yang digunakan mencapai 60% dari total enzim yang diperjualbelikan di seluruh dunia (Ward 1985). Protease alkalin merupakan jenis protease yang paling banyak diaplikasikan dalam bidang industri.

Protease memiliki variasi pemilihan substrat yang lebih luas atau berbeda dalam hal aktivitasnya terhadap ikatan-ikatan peptida protein (Mathews and Holde, 1990). Berdasarkan *Nomenclature Comittee of The International Union of Biochemistry*, protease digolongkan dalam enzim hidrolase. Berdasarkan letak

pemecahan peptida, protease dapat dibedakan atas dua bagian, yaitu eksopeptidase dan endopeptidase. Eksopeptidase memotong ikatan peptida pada terminal amino (n-terminal) atau karboksil (c-terminal) dari substrat, sedangkan endopeptidase memotong bagian tengah dari ikatan peptida.

Berdasarkan sifat-sifat kimia dari lokasi aktifnya, Hartley (1960) membagi protease menjadi empat kelompok (Fersht, 1985; Whitaker, 1994; Winarno, 1983; deMan, 1997), yaitu protease serin (memiliki residu serin dalam lokasi aktifnya, misalnya tripsin, kimotripsin, elastase, trombin, kallikrein, plasmin, dan subtilisin), protease sulfhidril (memiliki residu sulfhidril dalam lokasi aktifnya, misal papain, fisin dan bromelin), protease logam (tergantung pada eksistensi logam, misalnya jenis karboksipeptidase), protease asam (memiliki dua gugus karboksil dalam lokasi aktifnya, misalnya pepsin, rennin, chymosin dan sejumlah besar protease mikroba).

Beberapa enzim protease yang tersedia secara komersial dan dapat digunakan untuk pembuatan HPI (Hidrolisat Protein Ikan) dapat berasal dari hewan, tanaman maupun mikroorganisme. Mikroorganisme adalah sumber enzim yang paling banyak digunakan dibandingkan dengan tanaman dan hewan. Sebagai sumber enzim, mikroorganisme lebih menguntungkan karena pertumbuhannya cepat, dapat tumbuh pada substrat yang murah, lebih mudah ditingkatkan hasilnya melalui pengaturan kondisi pertumbuhan dan rekayasa genetik, serta mampu menghasilkan enzim yang ekstrim. Salah satunya dengan menggunakan protease pada khamir laut.

Khamir laut adalah khamir yang dapat hidup dengan baik pada air laut dibandingkan air tawar (Kurtzman and Fell, 2000). Khamir laut diisolasi dari komponen laut dan tumbuh dengan baik pada media air laut. Khamir laut dapat digunakan sebagai salah satu sumber enzim. Khamir laut dengan spesies yang berbeda-beda dapat mengandung enzim yang berbeda juga, seperti amilase,

alkalinase, protease, protease asam, phytase, lipase dan inulinase (Chi, *et al.*, 2009).

Produksi protease dari khamir telah dilaporkan ditemukan pada jenis *Candida lipolytica*, *Yarrowia lipolytica* dan *Aureobasidium pullulans* (Tobe *et al.*, 1976 ; Ogrzydziak, 1993 ; Donaghy and Mickay, 1993). Menurut penelitian Ping, *et al.*, (2005), khamir laut mengandung enzim alkalin protease dengan aktivitas yang cukup tinggi yaitu 623.1U/mg. Ni, *et al* (2008) juga mengungkapkan bahwa strain khamir laut HN2-3 bisa menghasilkan sejumlah besar ekstraselular alkalin protease yang dikenal sebagai *Aureobasidium Pullulans*. Nilai konstanta Michaelis-Menten (K_m) dan kecepatan maksimal (V_{maks}) pada khamir laut strain 10 *A. Pullulans* dengan menggunakan kasein adalah 0,25 mg/ml dan 0,0286 mmol/min/mg protein. Berat molekul mikroorganismenya berkisar antara 15 kDa hingga 30 kDa. Berat molekul alkalin protease pada khamir laut strain 10 *A. Pullulans* adalah 32,0 kDa (Ma, *et al.*, 2007). Sehingga alkalin protease pada khamir laut dapat digunakan dengan baik untuk hidrolisis protein ikan.

Khamir laut yang diisolasi dari pantai Jawa Timur oleh Sukoso (2002) dan Wiyanto (2003) memiliki potensi bioteknologi di bidang pangan. Fahrudin (2002) melaporkan bahwa khamir laut sebagai penghidrolisis dalam pembuatan hidrolisat ikan peperek mempunyai aktivitas protease untuk menghidrolisis protein ikan peperek sehingga dapat meningkatkan nilai nutrisi asam amino. Selain itu, Waluyo (2001) melaporkan bahwa nutrisi asam lemak pada pembuatan hidrolisat protein ikan peperek dengan khamir laut juga meningkat, khususnya *decosahexaenoic acid* (DHA) dan *eicosapentaenoic acid* (EPA).

Ikan peperek terutama bagian kepala kurang dimanfaatkan dan menjadi limbah perikanan. Sampai saat ini pemanfaatannya masih dalam bentuk tepung ikan, dan pakan ternak yang bernilai ekonomis rendah. Alternatif pemanfaatan kepala ikan peperek adalah digunakan sebagai produk hidrolisat protein ikan.

Kepala ikan memiliki nilai nutrisi yang cukup baik untuk dimanfaatkan sebagai bahan hidrolisat protein ikan terutama memiliki kandungan proteinnya sebesar 15 gram/100 gram dan asam-asam amino yang cukup baik yaitu tryptophan, threonin, isoleusin, leusin, lysine, methionin, cystin, phenylalanin, tyrosin, valin, arginin, histidin, alanin, asam aspartat, asam glutamat, glisin, prolin, serin, hydroxyprolin. Arnesen and Gildber (2009) menyatakan bahwa kepala ikan cod memiliki *raw material* yang kompleks yaitu terdiri dari otot 45%, daging 12 %, 3 % visceral, tulang 20%, insang 15% , kulit 5 % and mata 4 % dan memiliki nilai rata-rata protein sebesar 15 %.

Penelitian Sathivel, *et al.*, (2003), menggunakan ikan hering (*Clupea harengus*) sebagai material yang akan dihidrolisis proteinnya. Bagian-bagian yang dihidrolisis meliputi ikan hering utuh, daging ikan hering, kepala dan gonad ikan hering. Penelitian ini memperlihatkan hasil bahwa % derajat hidrolisis dari bagian kepala ikan hering memiliki % derajat hidrolisis terbesar yaitu sebesar 18 % selama 75 menit. Batista *et al* (2009), menghidrolisis *by product* ikan scabbard hitam (terdiri dari kepala, kulit, visceral dan tulang) memiliki nilai derajat hidrolisis 57 %. Prosentase derajat hidrolisis mengalami peningkatan sebanding dengan lama (waktu) hidrolisis yang diperlukan.

Hidrolisat protein ikan didefinisikan sebagai protein yang mengalami degradasi hidrolitik menjadi senyawa-senyawa berantai pendek dengan penghidrolisis asam, basa kuat atau enzim dengan hasil akhir berupa campuran beberapa hasil. Bila hidrolisis dilakukan dengan sempurna maka akan diperoleh hidrolisat yang terdiri dari campuran 18 sampai 20 macam asam amino. Produk akhir dapat berbentuk cair, pasta atau bubuk/tepung yang bersifat higroskopis (Ariyani, *et al.*, 2003).

Hidrolisat protein ikan merupakan sari pati protein dari ikan yang dapat digunakan sebagai makanan suplemen dan bahan fortifikasi untuk berbagai

makanan dengan cara penambahan enzim proteolitik untuk mempercepat proses hidrolisis dalam kondisi terkontrol dengan hasil akhir berupa campuran komponen protein. Hidrolisat protein ikan dapat diaplikasikan sebagai sumber asam-asam amino pada bahan pangan. Hidrolisat protein ikan mengandung asam-asam amino esensial, yaitu valin, metionin, lisin, isoleusin, histidin, leusin dan treonin (Pigott dan Tucker, 1990).

Manfaat produk hidrolisat protein ikan adalah sumber peptida, seperti pepton, sebagai media pertumbuhan mikroba (Gilberg *et al.* 1989). Beberapa penelitian menyatakan bahwa hidrolisat protein ikan menunjukkan secara efektif sebagai sumber nitrogen untuk pertumbuhan mikroba (Guerard *et al.* 2001). Hidrolisat protein ikan juga dapat meningkatkan absorpsi (Kristinsson and Rasco, 2000), produksi enzim (Ellouz *et al.* 2003), bermanfaat bagi kesehatan untuk aplikasi nutrisi dan farmasi (Rousseau *et al.* 2001).

Hidrolisis protein adalah proses penguraian protein menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana (asam-asam amino) baik oleh enzim, basa maupun asam. Proses hidrolisis dengan asam/basa dapat merusak sebagian asam amino dan juga menghasilkan senyawa beracun seperti lysin-alanin (Lahl and Braun, 1994). Hidrolisis protein menggunakan asam atau basa dalam industri makanan sangat tidak menguntungkan. Bahan makanan yang diproses menggunakan metode asam atau basa akan menghasilkan produk yang memiliki nilai nutrisi dan sifat fungsional yang rendah (Kistinsson and Rasco, 2000). Sementara hidrolisis secara enzimatik dapat memperkecil ukuran peptida, yang dapat merubah karakteristik dan meningkatkan kualitas protein (Petersen, 1981). Kristinsson and Rasco (2000) menambahkan bahwa hidrolisat protein menggunakan enzim proteolitik dapat memecah ikatan peptida.

Hidrolisis protein secara enzimatik merupakan cara hidrolisis protein yang efisien untuk melarutkan protein ikan. Protein yang dihidrolisis dengan

menggunakan enzim sangat tergantung pada tipe enzim, substrat, dan kondisi hidrolisis yang meliputi pH, suhu, lama inkubasi dan konsentrasi enzim hidrolisis (Adler-Nissen, 1986). Hidrolisat protein ikan dengan menggunakan enzim dapat meningkatkan karakteristik protein ikan dan memiliki nutrisi yang bagus, seperti komposisi asam-asam amino yang seimbang dan tingkat kelarutan yang tinggi (Gildberg, 1993; Nolsoe and Undeland, 2009).

1.2 Identifikasi Masalah

Hidrolisat protein ikan merupakan produk cairan yang dibuat dari ikan dengan penambahan bahan penghidrolisis berupa asam, basa atau enzim dengan hasil akhir berupa campuran komponen protein. Hidrolisis protein ikan yang paling efisien dan menguntungkan adalah hidrolisis secara enzimatik karena enzim menghasilkan peptida yang tinggi dan kurang kompleks serta mudah dipecah-pecah. Di samping itu, hidrolisis menggunakan enzim dapat menghasilkan hidrolisat yang terhindar dari perubahan dan penghancuran produk secara hidrolitik.

Protease adalah salah satu enzim yang dapat digunakan untuk hidrolisis protein ikan karena dapat menghidrolisis protein dengan memotong ikatan peptida dan mempercepat sintesis peptida. Keterbatasan kemampuan hewan dan tumbuhan dalam memenuhi permintaan protease, telah mendorong berkembangnya protease mikroorganisme salah satunya khamir (Putranto, 2006).

Khamir laut dapat memproduksi protease dengan aktivitas yang tinggi yaitu 623,1 U/mg (Chi *et al.*, 2006). Nilai konstanta Michaelis-Menten (K_m) dan kecepatan maksimal (V_{maks}) pada khamir laut strain 10 *A.Pullulans* dengan menggunakan kasein adalah 0,25 mg/ml dan 0,0286 mmol/min/mg protein dan

berat molekul sebesar 32,0 kDa (Ma *et al.*, 2007). Sehingga alkalin protease pada khamir laut dapat digunakan dengan baik untuk hidrolisis protein ikan.

Ikan peperek terutama bagian kepala kurang dimanfaatkan dan menjadi limbah perikanan. Sampai saat ini pemanfaatannya masih dalam bentuk tepung ikan, dan pakan ternak yang bernilai ekonomis rendah. Alternatif pemanfaatan kepala ikan peperek adalah digunakan sebagai produk hidrolisat protein ikan. Kepala ikan menurut penelitian Arnessen dan Gilberg (2009) memiliki nilai protein yang cukup tinggi yaitu 15 % dengan kandungan asam amino yang cukup bervariasi seperti aspartat, glutamat, serin, leusin, lisin, histidin, alanin, prolin, valin, methionin, arginin, phenilalanin dan valin.

Oleh karena itu, perlu diteliti mengenai karakteristik protease dari ekstrak khamir laut yaitu aktivitas protease dari khamir laut, konsentrasi protease khamir laut, konstanta Michaelis-Menten (K_m) dan kecepatan maksimal (V_{maks}). Karakteristik hidrolisis kepala ikan peperek dari ekstrak khamir laut meliputi DH (derajat hidrolisis), berat molekul (SDS PAGE) dan profil asam amino (HPLC).

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Mengetahui karakteristik protease dari ekstrak khamir laut meliputi aktivitas protease dari khamir laut, konsentrasi protease khamir laut, konstanta Michaelis-Menten (K_m) dan kecepatan maksimal (V_{maks}) .
2. Mengetahui karakteristik hidrolisis kepala ikan peperek dari ekstrak khamir laut meliputi DH (derajat hidrolisis), berat molekul (SDS PAGE) dan profil asam amino (HPLC).

1.4 Kegunaan Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai pemanfaatan khamir laut dibidang bioteknologi yang digunakan sebagai bahan penghidrolisis dalam proses pembuatan hidrolisat protein ikan peperek dan mengetahui karakteristik protease khamir laut.

1.5 Tempat Dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Mikrobiologi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, dan Laboratorium Kimia Organik Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Pada bulan Juli 2009 sampai Februari 2010.



2. Tinjauan Pustaka

2.1 Protease

Protease atau enzim proteolitik merupakan enzim yang memiliki daya katalitik yang spesifik dan efisien terhadap ikatan peptida dari suatu molekul polipeptida atau protein. Protease adalah kandungan esensial yang ada pada khamir, prokariot, tanaman dan hewan (Gupta, *et al.*, 2002). Protease dapat diisolasi dari tumbuhan (papain dan bromelin), hewan (tripsin, kimotripsin, pepsin, dan renin), mikroorganisme seperti bakteri, kapang, virus, dan cacing parasitik seperti cestoda, trematoda, dan nematoda.

Protease adalah enzim yang dapat memecah ikatan peptida menjadi asam-asam amino dan peptida sederhana. Protease merupakan enzim penting dan memiliki nilai ekonomi yang tinggi karena aplikasinya yang sangat luas. Industri pengguna protease diantaranya ialah industri deterjen, kulit, tekstil, makanan, hidrolisat protein, pengolahan susu, farmasi, makanan, bir, film, dan limbah (Moon dan Parulekar 1993). Oleh karena itu, tidak mengherankan apabila protease yang digunakan mencapai 60% dari total enzim yang diperjualbelikan di seluruh dunia (Ward 1985). Protease alkalin merupakan jenis protease yang paling banyak diaplikasikan dalam bidang industri.

Protease memiliki variasi pemilihan substrat yang lebih luas atau berbeda dalam hal aktivitasnya terhadap ikatan-ikatan peptida protein. Protease adalah enzim dengan massa molekuler kecil berkisar $15 \times 10^3 - 35 \times 10^3$ dalton, kecuali untuk leusin aminopeptidase dengan molekul 250×10^3 dalton (Winarno, 1995). Ada dua kelompok utama enzim protease yaitu golongan eksopeptidase (eksoprotease) dan endopeptidase (endoprotease). Eksopeptidase dibagi menjadi karboksi (ekso) peptidase dan amino (ekso) peptidase yang berturut-turut memotong peptida dari arah gugus karbonil terminal dan gugus amino

terminal. Sedangkan endopeptidase memecah protein atau ikatan peptida dari dalam (internal) peptida. Klasifikasi protease berdasarkan sifat-sifat kimia dari lokasi aktif dapat dibagi menjadi empat kelompok (Yatsunami and Takenaka, 2000), yaitu:

a) Protease Serin

Enzim ini memiliki residu serin dalam lokasi aktifnya dan bersifat endopeptidase, misalnya tripsin, kimotripsin, elastase, trombin, kallikrein, plasmin dan subtilin. Aktivitas enzim ini dihambat oleh diisopropil fluorofosfat (dfp), *soybean trypsin inhibitor* (sti), *l-1-p-tosilamino-2-feniletil klorometilketon* (tpck), aprotinin dan fenilmetilsulfanil fluorida (pmsf).

b) Protease Sulfhidril (protease thiol, protease sistein)

Enzim ini memiliki residu sulfhidril dalam lokasi aktifnya, bersifat endopeptidase dan dihambat oleh senyawa oksidator, alkilator dan logam berat. Asam *p*-kloro merkuri benzoat (pcmb), iodoasetat (iaa), *n*-etilmaleimida (nem) dan leupeptin merupakan inhibitor spesifik enzim ini. protease dari tumbuhan dan mikroba seperti papain, fisin dan bromelin termasuk dalam golongan ini.

c) Protease Logam (metalloprotease)

Aktivitas dari enzim ini tergantung pada eksistensi logam yang umumnya memenuhi hubungan stoikiometrik dengan satu mol logam untuk tiap mol enzim. logam tersebut misalnya magnesium (Mg), zink (Zn), kobal (Co), besi (Fe), merkuri (Hg), nikel (Ni) dan sebagainya sehingga enzim ini dapat dihambat oleh asam etilendiamina tetraasetat (edta) yang dapat mengkelat logam dan menurunkan aktivitasnya, serta 1,10-fenantrolin.

d) Protease Asam (aspartil protease, karboksil protease)

Enzim ini bersifat endopeptidase, memiliki dua gugus karboksil dalam lokasi aktifnya dan aktif hanya pada pH rendah, serta dapat dihambat oleh *p*bromofenasilbromida dan pepstatin. *Pepsin*, *rennin*, *chymosin* dan protease

kapang termasuk dalam golongan ini. Berdasarkan sumbernya, enzim protease dikategorikan menjadi tiga yaitu hewani, nabati dan mikroba (bakteri, ragi dan kapang). Protease nabati meliputi papain dan bromelin, sedangkan pepsin, rennin, kolagenase hewan, tripsin, kimotripsinogen dan elastase bersumber dari hewani, serta yang bersumber dari mikroba (Shimuta *et al.*, 2000).

2.2 Khamir Laut

Khamir (*yeast*) adalah fungi uniseluler yang bereproduksi seksual dengan spora dan aseksual dengan pertunasan, pembelahan atau kombinasi keduanya (Kreger, 1984). Habitat khamir amat luas dan beragam sesuai dengan jenis strainnya (Walkel, 1998). Khamir yang mampu hidup di lingkungan bersalinitas tinggi dikenal dengan nama khamir laut. Zona dan kepadatan perairan laut menentukan kepadatan khamir. Populasi khamir makin menurun kepadatannya seiring bertambahnya kedalaman dan semakin jauhnya dari daratan. Lautan lepas mengandung khamir dengan kepadatan 10 sel/liter atau kurang. Khamir masih bisa didapatkan pada kedalaman kurang dari 1000 m, lebih tinggi dibandingkan zona laut dalam. Pada kedalaman lebih dari 1000 m hanya didapatkan khamir dengan kepadatan 25 % dibanding dengan zona yang lebih dangkal. Perbedaan kepadatan itu disebabkan semakin menurunnya kadar O_2 dan meningkatnya kadar H_2S (Pelczar, 1989). Khamir laut pertama kali diisolasi pada tahun 1886 oleh Fischer tahun 1894 dilanjutkan oleh Zo Bell dan Feltham (Kohlmayer dan Kohlmayer 1979) sejarah dan perkembangan isolasi dan purifikasi khamir laut dapat dilihat pada Tabel 3.

Selama ini khamir laut sudah dimanfaatkan dalam bidang perikanan, khususnya sebagai pakan ikan. Namun, jika dilihat dari potensi pemanfaatannya, prospek khamir laut tidak hanya terbatas pada pengembangan ikan saja. Namun dapat diolah sebagai produk pangan bahkan *food supplement* yang bernilai gizi

tinggi (Wiyanto dan Sukoso, 2000). Khamir laut sebagaimana umumnya memiliki potensi bioteknologi yang sangat besar. Ada dua potensi besar khamir laut yaitu hidup pada substrat yang memiliki nilai nutrisi yang sangat tinggi (Adam dan Moss, 2000) sehingga memiliki komposisi nutrisi yang kompleks dan lengkap pula termasuk vitamin dan asam amino (Kinsella, 1987), potensi yang kini dikembangkan dalam menghasilkan alternatif sumber pangan bagi nutrisi manusia (misalnya;protein sel tunggal). Potensi kedua adalah setelah penemuan Pasteur, metabolisme alami dari khamir menjadi salah satu bagian penting dalam perkembangan teknik fermentasi bahan pangan, dimana tidak diragukan bahwa fermentasi dimasa akan datang akan terus mendapat peningkatan perhatian sebagai proses pengawetan dan pengolahan bahan pangan yang dapat dihasilkan nilai gizi tinggi.

Menurut Ping *et al.*, (2006), khamir laut yang diisolasi dari laut Cina Selatan mengandung enzim alkalase dengan aktivitas yang tinggi 623.1U/mg. Chi *et al.*, (2006) melaporkan bahwa khamir laut dengan strain *Aureobasidium pullulans* yang diisolasi dari sedimen pantai di Qing dau, China, memiliki aktivitas protease 623.1U/mg ada dalam medium yang mengandung 2,5 gram pati larut air dan 2 gram NaNO₃, 100 mL air laut, pH 6 dan setelah difermentasi pada suhu 24,5 °C selama 30 jam. Protease kasar yang terkandung dalam strain 10 *A.Pullulans* mempunyai aktivitas yang tinggi pada pH 9 dan suhu 45 °C.

Ni, *et al.*, (2008) juga mengungkapkan bahwa sel khamir memiliki kandungan alka lin protease yang cukup tinggi. Strain khamir laut HN2-3 bisa menghasilkan sejumlah besar ekstraselular alka lin protease yang dikenali sebagai *Aureobasidium Pullulans*. Alka lin protease yang ada pada khamir laut dapat digunakan untuk memproduksi bioaktif peptida dari sumber protein laut.

Alka lin protease pada khamir laut mempunyai pH optimal 9 dan stabil pada pH 4 hingga 12. Suhu optimalnya adalah 45 °C dan stabil diatas 20 °C. Nilai

konstanta Michaelis-Menten (K_m) dan kecepatan maksimal (V_{maks}) pada khamir laut strain 10 *A. Pullulans* dengan menggunakan kasein adalah 0,25 mg/ml dan 0,0286 mmol/min/mg protein dan memiliki berat molekul sebesar 32,0 kDa (Ma, *et al.*, 2007). Karakteristik dari alkalin protease dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Karakteristik Alkalin Protease

| Jenis | Berat Molekul | pH dan Suhu Optimal | Senyawa/zat pengaktif | Senyawa/zat penghambat | Hidrolisis | Ukuran gen |
|--|---------------|---------------------|---|---|--|------------------------|
| 1) Khamir laut <i>A. Pullulans</i> HN2-3 | 33,0 kDa | 9,0 52 °C | Zn ²⁺ , Mn ²⁺ , Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Na ⁺ | PMSF, 1-10 phenanthroli, EDTA dan asam iodoasetik | Memproduksi bioaktif peptida dari protein laut | 1248 bp (54 dan 52 bp) |
| 2) Khamir laut <i>A. Pullulans</i> strain 10 | 32,0 kDa | 9,0 45 °C | Cu ²⁺ dan Mn ²⁺ | Hg ²⁺ , Fe ²⁺ , Fe ³⁺ , Zn ²⁺ , dan Co ²⁺ , PMSF, phenanthroli, EDTA dan asam iodoasetik | Memproduksi bioaktif peptida dari protein laut | 1248 bp (54 dan 50 bp) |
| 3) Khamir pada umumnya (hidup didarat) | 32 kDa | 9-11 50-70 °C | Tidak diketahui | PMSF | Tidak diketahui | 1364 bp |

Sumber :1) Ni, *et al.*, (2008),
2) Ma, *et al.*, (2007)
3) Madzak, *et al.*, (2004)

2.3 Hidrolisat Protein Ikan

Hidrolisat protein ikan adalah produk yang dihasilkan dari penguraian protein ikan menjadi senyawa-senyawa berantai pendek karena adanya proses hidrolisis baik oleh enzim, asam maupun basa. Hidrolisat yang sempurna akan menghasilkan 18-20 jenis asam amino. Hidrolisat protein ikan (HPI) merupakan pengembangan dari proses pembuatan konsentrat protein ikan dan silase. Dimana pada kedua produk tersebut protein yang diperoleh mempunyai sifat fungsional yang sangat rendah, sehingga pada umumnya produk yang

dihasilkan hanya sebatas digunakan untuk pakan ternak. Untuk itu, pengolahan ikan menjadi HPI diharapkan dapat memperbaiki sifat-sifat tersebut, sehingga dapat dimanfaatkan untuk produk pangan manusia (Pigot dan Tucker, 1990).

Hidrolisat protein ikan dikarakteristik dengan kelarutan yang tinggi di dalam air dan kandungan protein tinggi, sementara itu kandungan lemak dan abu HPI sangat rendah. Penggunaan spesies ikan, enzim dan kondisi daya cerna yang berbeda, menghasilkan hidrolisat yang berbeda pula. Spesies ikan yang rendah lemak merupakan bahan baku yang ideal untuk hidrolisat protein ikan. Ikan berlemak seperti herring membutuhkan perlakuan dengan etanol untuk menghilangkan lemak sebelum proses hidrolisis enzimatik. Karakteristik HPI dapat dirubah dengan menggunakan enzim spesifik dan menkondisikan suhu, pH dan waktu (Kristiansson *et al.* 2000).

Produk hidrolisat protein dari bahan baku ikan ditentukan oleh jenis ikan yang digunakan. Pemanfaatan ikan yang mengandung banyak lemak akan menghasilkan hidrolisat dengan kandungan lemak tinggi, sehingga akan memperpendek masa simpan. Hal lain yang berpengaruh adalah jenis katalis yang digunakan. Hidrolisat protein yang dibuat dari ikan berlemak rendah (*non fatty fish*), mengandung protein 85-90%, lemak 2-4% dan abu 6-7% berdasarkan berat kering (Pigot dan Tucker, 1990).

Pada pembuatan hidrolisat protein, beberapa faktor sangat berpengaruh terhadap kecepatan hidrolisis dan kekhasan produk, yaitu suhu, waktu hidrolisis, dan konsentrasi enzim yang ditambahkan, sedangkan tingkat kerusakan asam amino dipengaruhi oleh kemurnian protein dari bahan awal, serta kondisi dan jenis bahan penghidrolisis yang digunakan. Lama proses hidrolisis merupakan faktor yang paling berpengaruh terhadap mutu hidrolisat yang dihasilkan. Waktu hidrolisis yang berlebih menyebabkan jumlah peptida dan asam amino menurun dan jumlah padatan tidak fungsional meningkat (Pigot dan Tucker, 1990). Bila

hidrolisis dilakukan dengan sempurna maka akan diperoleh hidrolisat dengan 18-20 macam asam amino. Produk akhir hidrolisat protein dapat berupa cair, pasta atau bubuk yang bersifat higroskopis (Gopakumar, 1998):

Teknologi pengolahan untuk memproduksi hidrolisat protein merupakan teknologi murah dan mesin pengolahnya telah tersedia komersial. Salah satu keuntungan terbesar dari produk ini adalah semua jenis hasil samping perikanan dan ikan-ikan rucah (bernilai ekonomis rendah) dapat digunakan untuk memproduksi hidrolisat dibanding produk-produk perikanan lainnya yang hanya dapat diproduksi dengan jenis-jenis ikan tertentu (Schimidi *et al.*, 1994).

Proses pembuatan hidrolisat protein ikan yang paling efisien adalah secara enzimatis karena enzim menghasilkan peptida yang tinggi dan kurang kompleks serta mudah dipecah-pecah. Di samping itu, hidrolisis menggunakan enzim dapat menghasilkan hidrolisat yang terhindar dari perubahan dan penghancuran produk secara hidrolitik, karena pada proses hidrolisis dengan asam maupun basa dapat merusak sebagian asam amino dan juga menghasilkan senyawa beracun seperti lisin-alanin (Lahl dan Braun, 1994).

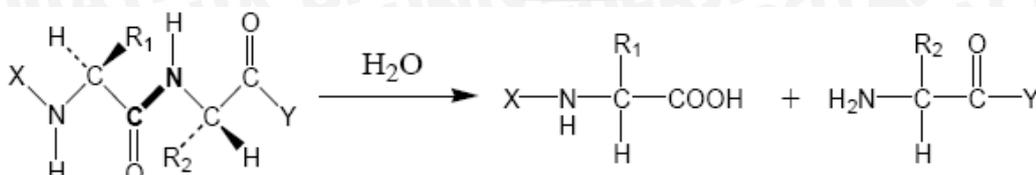
Hidrolisat protein ikan dibuat dari ikan yang ditambahkan enzim proteolitik dan menjadi pertimbangan sebagai pendekatan alternatif untuk merubah ikan yang kurang bermanfaat menjadi produk yang mengandung protein yang dapat dimakan, daripada menjadi pakan ikan atau pupuk organik. Proses pembuatan HPI terdiri dari protease dan limbah ikan dengan mengkondisikan secara optimal pH dan suhu yang dibutuhkan enzim. Enzim dapat bersumber dari tumbuhan (papain, fisin), hewan (tripsin, pankreatin), atau mikroba (pronase, alkalase) (Loffler, 1986).

2.4 Hidrolisis

Hidrolisis adalah reaksi kimia dimana molekul air (H_2O) yang terdiri dari hydrogen kation (H^+) dan hidroksida anion (OH^-), reaksi inilah yang dibutuhkan untuk memecah polimer tertentu. Dalam kondisi normal, hanya sedikit reaksi antara air dan senyawa organik terjadi. Umumnya, asam kuat atau basa harus ditambahkan untuk mencapai hidrolisis di mana air tidak berpengaruh. Asam atau basa dianggap katalis.

Hidrolisis adalah proses penguraian protein menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana (asam-asam amino) baik oleh enzim, basa maupun asam. Proses hidrolisis dengan asam/ basa dapat merusak sebagian asam amino dan juga menghasilkan senyawa beracun seperti lisin-alanin (Lahl and Braun, 1994). Sementara hidrolisis secara enzimatik dapat memperkecil ukuran peptida, yang dapat merubah karakteristik dan meningkatkan kualitas protein (Petersen, 1981). Kristinsson and Rasco (2000) menambahkan bahwa hidrolisat protein menggunakan enzim proteolitik dapat memecah ikatan peptida.

Ikatan peptida yang membangun rantai polipeptida dalam protein dapat diputus (dihidrolisis) menggunakan asam, basa atau enzim (Mathews and Van Holde, 1990). Pemecahan ikatan peptida dalam kondisi asam atau basa kuat merupakan proses hidrolisis kimia dan pemecahan ikatan peptida menggunakan enzim merupakan proses hidrolisis biokimia (Kristinsson and Rasco, 2000). Reaksi hidrolisis peptida akan menghasilkan produk reaksi yang berupa satu molekul dengan gugus karboksil dan molekul lainnya memiliki gugus amina (Whitaker, 1994).



Gambar 1. Reaksi Hidrolisis Protein

2.4.1 Macam-macam Hidrolisis

a. Hidrolisis Murni

Direaksikan dengan H₂O saja, reaksi lambat sehingga jarang digunakan dalam industri (tidak komersial). Hanya untuk senyawa-senyawa yang reaktif. Reaksi dapat dipercepat dengan menggunakan H₂O uap (Kuswuruj, 2009).

Contoh :



b. Hidrolisis Asam/Basa

Metode hidrolisis protein secara kimia dapat dilakukan menggunakan asam kuat atau basa kuat dalam konsentrasi tinggi. Penggunaan asam dalam proses pengolahan makanan lebih sering dilakukan daripada penggunaan basa. Metode hidrolisis seperti ini telah lama dikenal dan diterapkan dalam industri makanan, namun cukup sulit untuk mengontrol proses hidrolisisnya. Hidrolisis protein menggunakan asam atau basa dalam industri makanan sangat tidak menguntungkan. Bahan makanan yang diproses menggunakan metode asam atau basa akan menghasilkan produk yang memiliki nilai nutrisi dan sifat fungsional yang rendah. Hidrolisis menggunakan asam menghasilkan produk (hidrolisat) yang memiliki kelarutan tinggi. Asam yang sering digunakan adalah asam klorida atau asam sulfat pekat pada temperatur dan tekanan tinggi untuk mendapatkan hidrolisis protein yang sempurna. Selanjutnya, perlu dilakukan netralisasi sisa asam dan dalam hidrolisat terkandung kadar garam (NaCl) yang tinggi sehingga dapat mempengaruhi sifat fungsional makanan. Selain itu, hidrolisis asam juga dapat merusak triptofan yang merupakan salah satu jenis asam amino yang dibutuhkan oleh tubuh. Penggunaan basa dalam hidrolisis protein menghasilkan produk (hidrolisat) yang memiliki kelarutan rendah. Kelarutan hidrolisat yang rendah ini berkaitan dengan hasil hidrolisis yang berupa

molekul polipeptida yang cukup besar. Selain itu, hidrolisat yang dihasilkan juga memiliki sifat fungsional yang rendah. Beberapa asam amino, seperti sistein, serin dan treonin, dapat hilang selama proses hidrolisis protein (Kristinnson and Rasco, 2000).

c. Hidrolisis Enzimatis

Proses hidrolisis protein secara enzimatis dapat dilakukan dengan penambahan enzim spesifik untuk hidrolisis ikatan peptida, yaitu enzim proteolitik (protease). Pemotongan ikatan peptida yang dilakukan oleh protease sangat spesifik pada daerah residu asam amino tertentu. Beberapa protease disekresikan dalam sistem pencernaan hewan untuk mendegradasi protein menjadi molekul polipeptida atau asam amino yang mudah untuk diserap (Mathews and Van Holde, 1990). Contoh protease yang telah banyak dikenal adalah papain, tripsin, kimotripsin, bromelin dan pepsin. Proses hidrolisis protein secara enzimatis merupakan suatu proses yang berguna untuk meningkatkan atau memodifikasi sifat fisikokimia, fungsional dan penampilan (visual) alami protein tanpa mengurangi nilai nutrisi makanan dan dapat juga meningkatkan daya serap protein (Kristinnson and Rasco, 2000).



3. MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Bahan Penelitian

Bahan utama dalam penelitian ini adalah khamir laut hasil kultur dan ikan peperek. Bahan kimia yang digunakan adalah 0,5 % kasein dalam glisin NaOH (0,05 mol L⁻¹), TCA (trichloroacetic acid 10 % dan 20 %, tlosin 3000 ppm, *Folin-phenol Ciocalteu reagen*, BSA (*Bovine Serum Albumin*), aquadest, reagen biuret, NaOH, KI, CuSO₄, NaOH 2 N, H₂SO₄, NaOH, KNa tartrat dan larutan nesler, *separating gel* (12,5%), *stacking gel* (12,5%), *reducing sampel buffer* (RSB), *amonium persulfat* (APS), *tetrametiletilendiamin* (TEMED) dan Coomassie Brilliant Blue, *O-ftatalaldehid* (OPA).

3.1.2 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah pisau, baskom, blender, beaker glass 1000 ml, spatula, sentrifuse dingin (merk Hettich mikro 22 R), waterbath, pH meter, gelas ukur 1000 ml, stirrer, beaker glass, inkubator, falcon, apendorf, timbangan analitik, spektrofotometri, rangkaian alat SDS PAGE dan rangkaian alat HPLC.

3.2 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksploratif. Metode eksploratif adalah suatu metode yang bertujuan menghimpun informasi awal yang akan membantu upaya menetapkan masalah dan merumuskan hipotesis (Amirin, 2009). Bertujuan untuk mengungkap secara luas dan mendalam tentang sebab-sebab dan hal-hal yang mempengaruhi terjadinya sesuatu (Marzuki, 1999). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakteristik protease khamir laut sebagai bahan penghidrolisis hidrolisat protein ikan peperek.

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Penelitian Pendahuluan

Penelitian pendahuluan ini bertujuan untuk menentukan karakteristik protease dari ekstrak kasar khamir laut yaitu aktivitas protease dari khamir laut, konsentrasi enzim khamir laut, konstanta Michaelis-Menten (K_m) dan kecepatan maksimal (V_{maks}).

a) Uji Aktivitas Enzim Protease Khamir Laut

Prinsip kerja

Penentuan aktivitas protease dari ekstrak kasar khamir laut dengan metode kolorimetri pada panjang gelombang 650 nm menggunakan *Folin-phenol reagent* (Lowry *et al.* 1951). Prinsip kerja penentuan aktivitas protease didasarkan pada pembentukan Cu (II)-protein, yang dalam suasana alkalis Cu (II) akan tereduksi menjadi Cu (I). Ion Cu^+ kemudian akan mereduksi *Folin-phenol reagent*, *phosphomolibdat-phosphotungstat* (*phosphomolybdotungstate*), menghasilkan *heteropolymolybdenum blue* akibat reaksi oksidasi gugus aromatik (rantai samping asam amino) terkatalis Cu, yang memberikan warna biru intensif yang dapat dideteksi secara kolorimetri. Kekuatan warna biru terutama bergantung pada kandungan residu triptopan dan tirosin-nya dan dibaca pada panjang gelombang 650 nm.

Preparasi bahan

- Khamir laut disentrifuse dingin dengan kecepatan 5000 rpm 4°C selama 10 menit untuk memperoleh supernatan
- Membuat kasein 0,5 % dalam glisin NaOH ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$), dengan cara :

Untuk kasein 0,5 % :

Larutkan 0,25 gram kasein dalam 5 ml aquadest, tambahkan 1,3 ml NaOH 1 M dan 30 ml aquadest lalu distirer. Tambahkan 5 ml buffer borat lalu diatur hingga

memiliki pH 8 dengan menambahkan HCl. Lakukan pengenceran larutan dengan aquadest sampai volume 50 ml.

Untuk glisin NaOH ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$):

2 gram NaOH ditambah 3,7535 gram glisin dilarutkan dengan 100 ml aquadest

Maka kasein 0,5 % dalam glisin NaOH ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) adalah 1 ml kasein ditambah dengan 1 ml glisin NaOH ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$)

- Tirosin 5000 rpm, cara membuatnya yaitu larutkan 75 mg tirosin dalam 25 ml aquadest
- *Reagen folin-phenol ciocalteu* : reagen diencerkan dalam aquadest dengan perbandingan 1 : 2.

Prosedur

Tabel 2. Skema kerja uji aktivitas protease khamir laut

| Perlakuan | Volume (ml) | | |
|---|-------------|---------|--------|
| | Sampel | Standar | Blanko |
| 0,5 % kasein dalam glisin NaOH | 1 | 1 | 1 |
| Supernatan hasil sentrifuse dingin dengan kecepatan 5000 rpm dengan suhu $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 10 menit | 0,5 | - | - |
| Tirosin 3000 rpm | - | 0,5 | - |
| Aquadest | - | - | 0,5 |
| Diinkubasi $45 \text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 30 menit didalam waterbath | | | |
| Larutan TCA 10 % sebanyak 2 ml | 2 | 2 | 2 |
| Disentrifuse dingin dengan kecepatan 10.000 rpm suhu $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 10 menit | | | |
| Supernatan | 1 | 1 | 1 |
| Reagen Folin- <i>phenol Ciocalteu</i> | 2 | 2 | 2 |
| Diinkubasi pada suhu $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 20 menit | | | |
| Ditentukan kandungan tirosin dengan spektrofotometri 650 nm | | | |

Penentuan Rumus

Perhitungan Uji Aktivitas Protease :

$$U = \frac{\text{absorbansi sampel} - \text{absorbansi blanko}}{\text{absorbansi standar} - \text{absorbansi blanko}} \times F_p \times \frac{1}{t \text{ inkubasi}}$$

b) Uji Konsentrasi Enzim Protease Khamir Laut

Prinsip Kerja

Penentuan konsentrasi enzim dari ekstrak kasar khamir laut menggunakan metode biuret dengan menambahkan larutan standar protein BSA. Prinsip kerja metode biuret adalah senyawa dengan 2 atau lebih ikatan peptida apabila direaksi dengan garam kupri dalam suasana basa akan membentuk warna violet. Reaksi biuret bergantung pada pembentukan suatu kompleks antara ion Cu^{2+} dengan 4 atom N-peptida pada suasana basa, maka akan membentuk suatu kompleks warna ungu yang absorbansinya dapat dibaca pada panjang gelombang 540 nm. Kelebihan BSA adalah harga yang lebih murah, larutan stabil pada pemanasan 70°C selama 30 menit, lebih spesifik karena 95% protein terdiri dari albumin. Adapun kelebihan metode biuret ini sendiri adalah lebih spesifik untuk peptida, polipeptida, dan protein, tidak bereaksi dengan ammonia, urea, dan senyawa nitrogen sederhana.

Preparasi bahan

- Khamir laut disentrifuse dingin dengan kecepatan 5000 rpm 4°C selama 10 menit untuk memperoleh supernatan

- Pembuatan larutan standar

- Larutan standar 400 ppm

$$V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

$$V_1 \cdot 1500 = 1.400$$

$$V_1 = 0,267 \text{ mL}$$

$$V_1 = 267 \text{ } \mu\text{L}$$

Jadi, larutan stok 1500 ppm yang digunakan untuk membuat larutan standar 1200 ppm adalah sebanyak 267 μL dalam 733 μL .

- Larutan standar 600 ppm

$$V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

$$V_1 \cdot 1500 = 1.600$$

$$V_1 = 0,4 \text{ mL}$$

$$V_1 = 400 \text{ } \mu\text{L}$$

Jadi, larutan stok 1500 ppm yang digunakan untuk membuat larutan standar 600 ppm adalah sebanyak 400 μL dalam 600 μL .

- Larutan standar 800 ppm

$$V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

$$V_1 \cdot 1500 = 1.800$$

$$V_1 = 0,53 \text{ mL}$$

$$V_1 = 530 \text{ } \mu\text{L}$$

Jadi, larutan stok 1500 ppm yang digunakan untuk membuat larutan standar 800 ppm adalah sebanyak 530 μL dalam 470 μL .

- Larutan standar 1200 ppm

$$V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

$$V_1 \cdot 1500 = 1.1200$$

$$V_1 = 0,8 \text{ mL} = 800 \text{ } \mu\text{L}$$

Jadi, larutan stok 1500 ppm yang digunakan untuk membuat larutan standar 1200 ppm adalah sebanyak 800 μL dalam 200 μL aquadest.

- Reagen biuret 25 mL : larutkan 0,0375 g tembaga (II) sulfat (CuSO_4), KI 0,025 g dan kalium natrium tartrat ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$) 0,15 g dalam Aquadest 17,5 mL, lalu ditambahkan 7,5 mL NaOH 2,5 M.

Prosedur

1. Siapkan appendorf 1,5 mL sebanyak 12 buah (duplo), isi masing-masing dengan aquadest dan larutan stock (BSA) sehingga didapatkan konsentrasi yang diinginkan (sesuai perhitungan pengenceran), lalu vortex.
2. Ambil 1 mL larutan dari masing-masing appendorf, lalu pindahkan ke dalam tabung reaksi
3. Tambahkan masing-masing tabung dengan 2 ml reagen biuret (1:2)
4. Inkubasi pada 37 $^{\circ}\text{C}$, 20 menit
5. Baca absorbansi pada 540 nm dengan spektrofotometer

Penentuan Rumus

Konsentrasi protein dihitung dengan kurva standar protein sebagai berikut :

$$Y = a + bX$$

Dimana : Y = absorbansi.

X = konsentrasi.

Konsentrasi protein khamir laut = $\mu\text{g}/\text{mL}$

c) Penentuan K_m dan V_{maks}

Prinsip kerja

Prinsip kerja penentuan K_m dan V_{maks} adalah maksimal kecepatan proses enzim; dapat mendekati kecepatan V_{maks} tapi tidak akan pernah mencapainya dan Michaelis-Menten konstan, sama dengan konsentrasi di mana laju proses sama dengan setengah dari tingkat maksimum. Penentuannya menggunakan reaksi

larutan folin-phenol ciocalteu dengan sampel dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 650 nm.

Preparasi bahan

- Khamir laut disentrifuse dingin dengan kecepatan 5000 rpm 4°C selama 10 menit untuk memperoleh supernatan
- Reagen *folin-phenol ciocalteu* : reagen diencerkan dalam aquadest dengan perbandingan 1 : 2

Prosedur

Substrat kepala ikan peperek diencerkan dengan aquadest dengan perbandingan 1:2; 1:4; 1:6; 1:8 dan 1:10. Masing-masing pengenceran dihidrolisis enzimatis menggunakan enzim protease khamir laut selama 190 menit dan disentrifuse 5000 rpm selama 10 menit. Hasil sentrifuse ditambah folin-phenol ciocalteu dengan perbandingan sample dan folin-phenol ciocalteu 1:2, kemudian diinkubasi 37 °C selama 10 menit. Diukur absorbansinya pada panjang gelombang 650 nm.

Penentuan Rumus

Nilai V_{maks} dan K_m ditentukan dari grafik *plot Lineweaver-Burk* laju reaksi enzim (maksimum) terhadap konsentrasi substrat.

3.3.2 Penelitian Inti

a) Hidrolisis Protein Ikan

Prinsip kerja

Hidrolisat protein ikan adalah penguraian protein ikan menjadi senyawa-senyawa berantai pendek karena adanya proses hidrolisis. Proses hidrolisis dilakukan secara enzimatis yaitu menggunakan protease khamir laut. Prinsip kerja hidrolisis protein adalah menghidrolisis protein dengan penambahan air untuk memotong

ikatan peptida dan mempercepat sintesis peptida dalam pelarut organik dan pelarut tersebut megandung air dengan tekanan rendah.

Preparasi bahan

- Khamir laut disentrifuse dingin dengan kecepatan 5000 rpm 4°C selama 10 menit untuk memperoleh supernatan
- Substrat kepala ikan peperek

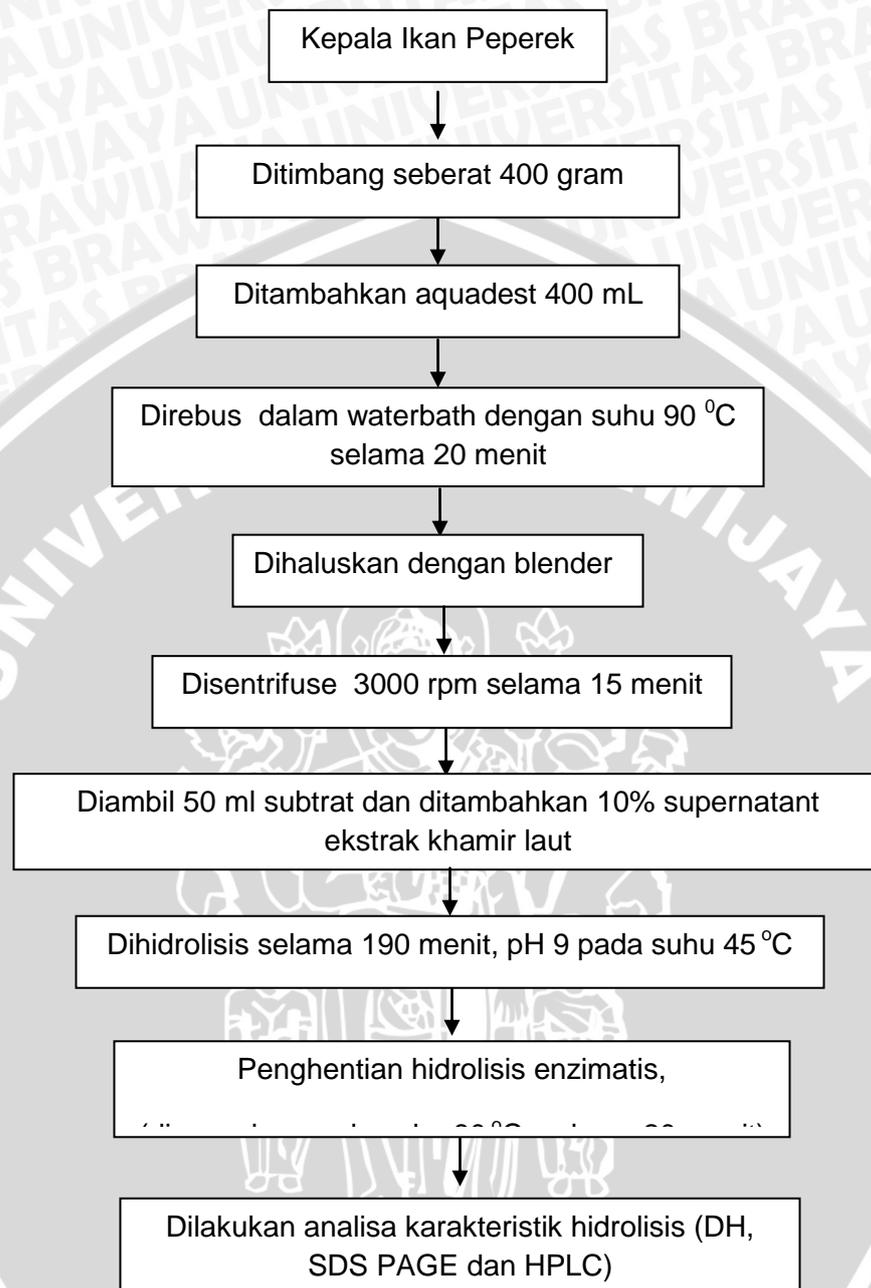
Ikan peperek dipotong bagian kepalanya dengan panjang $\pm 2,5$ cm, kepala ikan peperek ini terdiri dari otot, sebagian kecil daging, tulang, sebagian kecil visceral, insang, kulit dan mata.



Gambar 2. Ikan Peperek (*Leiognathus* sp.)

Kepala ikan peperek dicuci bersih dan ditambahkan aquadest (1:1), kemudian dipanaskan 90 °C selama 20 menit dalam waterbath dan dihaluskan dengan menggunakan blender selama ± 10 menit, kemudian disentrifuse dengan kecepatan 4500 rpm selama 15 menit (MISTRAL 1000) dalam apendorf 15 mL dan diambil supernatannya.

Prosedur



Gambar 3. Posedur Hidolisis Protein Kepala Ikan Peperek

b) **Kaeakteristik Hidrolisis Kepala Ikan Peperek**

- **Derajat Hidrolisis (Hoyle dan Merrit, 1994)**

Prinsip kerja

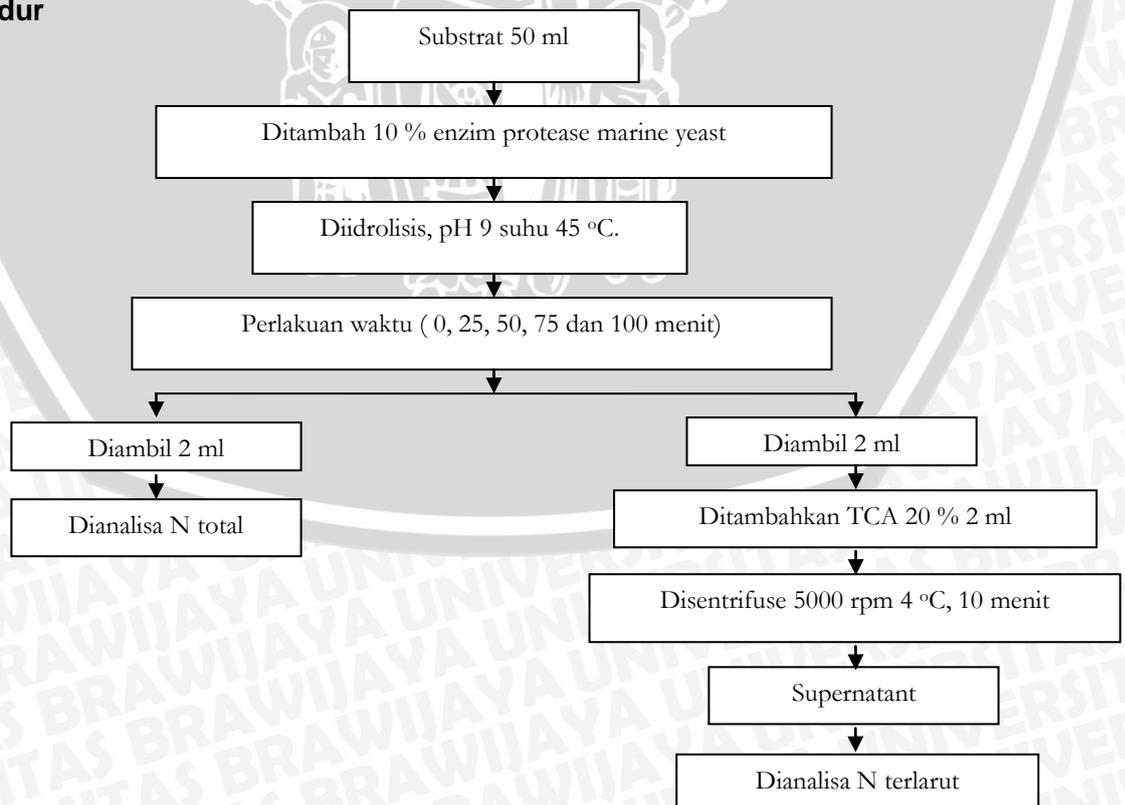
Prinsip kerja derajat hidrolisis adalah perbandingan persen banyaknya ikatan peptida yang terpecah (N) terhadap total jumlah ikatan peptida per satuan massa (N total). Substrat dan 10 % enzim yang dihidrolisis dan ditambahkan TCA 20 % untuk mendapatkan 10 % TCA larut dalam nitrogen dan 10 % TCA tidak larut dalam nitrogen.

Preparasi bahan

- Khamir laut disentrifuse dingin dengan kecepatan 5000 rpm 4°C selama 10 menit untuk memperoleh supernatan
- Substrat kepala ikan peperek

Kepala ikan peperek dicuci dan ditambahkan aquadest (1:1), kemudian dipanaskan 90 °C selama 20 menit dan diblender.

Prosedur



Gambar 4. Prosedur Analisa Derajat Hidrolisis

Rumus

$$DH = \frac{10\% \text{ nitrogen terlarut sampel}}{\text{Total N dalam sampel}}$$

• SDS PAGE

Prinsip kerja

Prinsip dasar SDS-PAGE ini adalah denaturasi protein oleh *sodium dodecyl sulphate* yang dilanjutkan dengan pemisahan molekul berdasarkan berat molekulnya dengan metode elektroforesis yang menggunakan gel, dalam hal ini digunakan *polyacrylamide*.

Prosedur

1. Persiapan Gel

Gel Pemisah (Separating Gel)

Separating gel merupakan media penyangga sebagai tempat bermigrasinya molekul protein. Separating gel 12,5 % dibuat dengan mencampurkan bahan-bahan pembuatan separating gel dalam tabung propilen dengan volume tertentu. Yang pertama dimasukkan adalah 2063 μl Acrilamida 30% dicampur dengan 1250 μl Tris HCl 1,5 M pH 8,8 ; 1635 μl aquabidest, dan 50 μl 10% SDS. Bahan tersebut tidak perlu urut ketika dimasukkan dalam tabung propilen. Selanjutnya ditambahkan 50 μl 10 % APS dan ditambah dengan 10 μl temed. Penambahan kedua bahan ini harus urut dan tabung propopilen digoyang perlahan agar semua bahan tercampur.

Gel poliakrilamid akan dibentuk dari polimer acrilamide dengan suatu *cross linking agent* yaitu N,N'-methylene bisacrilamide. Polimerisasi ini dikatalis oleh APS yang dapat menghasilkan radikal bebas. Pembentukan radikal bebas dari



APS dikatalis oleh temed. Hal inilah yang menyebabkan mengapa penambahan APS dan temed harusurut.

Sesudah semua bahan tercampur maka dituangkan dalam *plate* pembentuk gel dengan menggunakan pipet sampai pada batas *separating gel*. Selanjutnya ditambahkan aquadest agar permukaan gel yang terbentuk rata. Setelah gel terbentuk, aquadest yang ditambahkan tadi dibuang dan *plate* siap untuk ditambah dengan *stacking gel*.

Gel Pengumpul (Stacking Gel)

Proses pembuatan *stacking gel* ini sama dengan pembuatan *separating gel*, hanya berbeda pada komposisi bahannya. Proses pembuatannya yaitu, dimasukkan tanpa harusurut 257,5 μ l 30% Stok Acrilamida, 312,5 μ l 1 M Tris-HCl pH 6,8 ; 662,5 μ l Aquabidest, dan 12,5 μ l 10 % SDS (*Sodium Dodecyl Sulphate*). Selanjutnya ditambahkan denganurut, 3,75 μ l 10 % APS dan 2,5 μ l temed serta digoyang perlahan. Sesudah itu dimasukkan dalam *plate* pembentuk gel di atas *separating gel* yang telah dibuat. Segera setelah penuangan selesai, sisir pembentuk sumur sampel dimasukkan dan ditunggu sampai terbentuk gel dari *stacking gel*. Setelah gel terbentuk, sisir diangkat perlahan-lahan dan sumuran sampel telah terbentuk dalam *stacking gel*. Hal ini berarti gel poliakrilamid siap digunakan untuk tahapan selanjutnya.

2. Injeksi sampel

Siapkan 20 μ l sampel dan tambahkan RSB (*Reducing Sampel Buffer*) 20 μ l (1:1). RSB terdiri dari 1 ml Tris-Cl pH 6,8 ; 0,8 ml gliserol ; 1,6 ml SDS (*Sodium Dodecyl Sulphate*) 10 % ; 0,4 ml β merchapto ethanol ; 0,2 ml bromophenol blue dan aquabidest 8 ml. Panaskan sampel dan RSB dalam air mendidih selama 5 menit untuk menonaktifkan enzim dan memutus rantai polimer protein.

Plate yang sudah berisi gel dimasukkan dalam *chamber* elektroforesis dan *running buffer* dituang hingga bagian atas dan bawah dari gel terendam. Sampel yang telah disiapkan dimasukkan ke dalam sumur sampel sebanyak 20 μ l.

3. **Running Sampel**

Running sampel merupakan proses pemisahan protein, yang mana protein akan bergerak dari elektroda negatif menuju elektroda positif sampai pada jarak tertentu tergantung pada berat molekulnya. Pada tahap ini, *chamber* elektroforesis yang lengkap dengan sampel dihubungkan dengan arus listrik dan diatur sistem arus dan voltasenya. *Running* sampel dilakukan pada arus 20 A dan voltase 220 V. *Running* sampel dikatakan selesai apabila warna pelacak atau *tracking dye* mencapai jarak 0,5 cm dari dasar gel atau kurang lebih 100 menit. Setelah selesai, *running buffer* dituang dan gel diambil dari *plate* untuk tahapan berikutnya.

4. **Pewarnaan Gel (Staining Gel)**

Pada tahap ini diperlukan larutan *staining* untuk mewarnai protein dan larutan *destaining* untuk menghilangkan warna pada gel dan memperjelas pita protein yang terbentuk. Gel yang telah diambil dari *plate* direndam dalam 25 ml larutan *staining* selama kurang lebih 1 jam, kemudian dibilas dengan air dan direndam dalam 50 ml larutan *destaining* selama kurang lebih 3 jam atau sampai pita protein terlihat jelas.

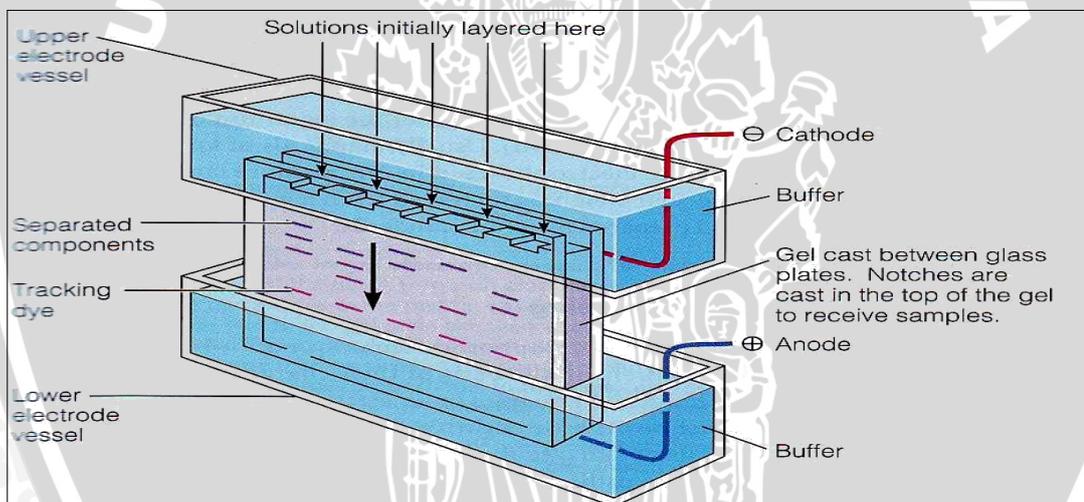
Dalam kondisi tidak diwarnai, protein tidak terlihat dan setelah diwarnai dengan larutan *staining* yang mengandung Coomassive Brilliant Blue R-25 0,01 % yang dilarutkan dalam methanol asam asetat dan air dengan perbandingan tertentu. Gel direndam dalam pewarna, kemudian dibilas dengan asam asetat jenuh. Protein menjadi berwarna biru karena mengikat Coomassie Brilliant Blue.



Dengan demikian dapat ditentukan mobilitas relatif protein untuk kemudian ditentukan berat molekulnya.

4. Visualisasi

Visualisasi merupakan tahap akhir berupa pencetakan hasil elektroforesis menjadi gambar atau foto, sehingga memudahkan dalam proses penentuan mobilitas relatif dan berat molekul protein. Selain itu juga merupakan proses penentuan konsentrasi protein pada masing-masing pita yang muncul dengan analisa densitometri. Densitometri menggunakan alat densitometer untuk mengetahui hasil elektroforesis secara kuantitatif (Franks, 1993). Rangkaian alat elektroforesis secara keseluruhan dapat dilihat pada Gambar 12.



Gambar 5. Rangkaian Alat SDS PAGE (Mathews, *et al*, 2000)

- **Analisa Profil Asam amino dengan HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*)**

Prinsip kerja

Dansil klorida (5-dimetilamino-1-naftalen sulfonil klorida) untuk derivatisasi asam-asam amino, menghasilkan derivat dansil yang bersifat fluorezen, kemudian akan dipisahkan dengan prosedur kromatografi kolom fase dibalik (*reversed phase column chromatography*). Hasil yang diperoleh dideteksi dan diukur dengan suatu detektor fluorezen.

Preparasi Bahan

Substrat kepala ikan peperek dihidrolisis secara enzimatik dengan protease ekstrak khamir laut selama 190 menit, pH 9 dan suhu 45 °C.

Prosedur

Persiapan alat dalam analisa profil asam amino :

| | |
|------------------------|--|
| Kolom | : Bio-Sil ODS-5S |
| Ukuran kolom | : 150x4.0 mm |
| Indeks kromatografi | : AP1 |
| Fase gerak | : A.Methanol, 5 mM sodium asetat dan sodium dibasic phosphate, pH 6,8 (2:2:96), B. 65 % methanol |
| Kecepatan aliran eluen | : 1 ml/menit |
| Suhu | : ruang |
| Pendeteksi | : UV 340 nm |

Prosedur analisa asam amino hidrolisat protein kepala ikan peperek adalah sampel sebanyak 25 µl ditambahkan larutan OPA sebanyak 100 ml. Menurut Prabowo (2002), menyatakan bahwa modifikasi struktur kimia asam amino dapat dilakukan dengan berbagai pereaksi salah satunya yaitu o-ftatalaldehid (OPA). Reaksi antara asam amino dengan reagen OPA menghasilkan alkiltiol-isoindol. Reaksi antara OPA dengan asam amino memiliki beberapa keuntungan yaitu reaksinya berjalan dengan cepat, mudah atau sederhana, dapat diotomatisasi,

dan waktu analisis relatif cepat. Sampel yang telah ditambah larutan OPA dikocok hingga homogen. Larutan didiamkan selama 5 menit, proses ini tidak boleh lebih dari 5 menit dikarenakan asam amino yang terkandung akan rusak. Langkah selanjutnya sampel sebanyak 20 µl siap untuk diinjeksikan ke HPLC (merk CBM-10A Shimadzu).



4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Karakteristik Protease Ekstrak Khamir Laut

Karakteristik protease ekstrak khamir laut meliputi aktivitas protease, konsentrasi protease ekstrak khamir laut, konstanta Michaelis-Menten (K_m) dan kecepatan maksimal (V_{maks}) dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Karakteristik Protease Ekstrak Khamir Laut

| Karakteristik | Kadar |
|-----------------|----------------------------|
| Konsentrasi | 2,217 ppm |
| Aktivitas Enzim | 21,50 mU/mL |
| V_{maks} | 15,57 mM min ⁻¹ |
| K_m | 7,187 x 10 ³ mM |

4.1.1 Konsentrasi Protease Ekstrak Khamir Laut

Tabel 3 memperlihatkan konsentrasi protease ekstrak khamir laut sebesar 2,217 ppm. Nilai ini menunjukkan banyaknya protein yang terdapat pada ekstrak khamir laut yang didapatkan. Enzim merupakan protein, sehingga secara kasar nilai tersebut dapat menggambarkan banyaknya enzim yang terdapat pada ekstrak khamir laut. Namun, nilai ini tidak dapat menggambarkan secara pasti banyak enzim yang terkandung didalamnya, sebab ekstrak yang didapat merupakan ekstrak kasar yang belum dilakukan pemurnian lebih lanjut.

4.1.2 Aktivitas Protease Ekstrak Khamir Laut

Aktivitas protease merupakan jumlah unit mg protease/mg protein. Satu unit aktivitas protease didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dapat menghasilkan satu μ mol produk tirosin per menit pada kondisi pengukuran. Tabel 3 memperlihatkan aktivitas protease pada ekstrak khamir laut sebesar 0,0215 U/mL, aktivitas ini kecil dibanding dengan aktivitas khamir laut murni.

Menurut Ping *et al.*, (2006), khamir laut yang diisolasi dari laut Cina Selatan mengandung enzim alkalase dengan aktivitas yang tinggi 623.1U/mg. Hal ini disebabkan karena khamir laut yang digunakan masih dalam bentuk ekstrak belum dilakukan pemurnian sehingga hasil yang didapat sangat kecil dibandingkan khamir laut yang sudah dimurnikan.

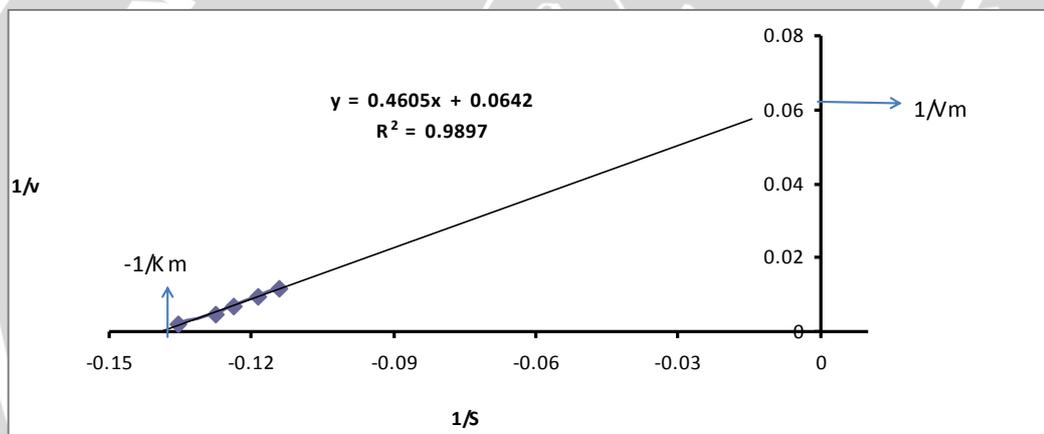
Bila dibandingkan dengan aktivitas ekstrak protease dari mikroorganisme lainnya, aktivitas ekstrak khamir laut ini masih kecil. Menurut penelitian Akhdiya (2003), hasil pengukuran aktivitas protease kasar dari isolasi bakteri penghasil enzim protease alkalin termostabil ini berkisar antara 0,087-106,450 U/ml filtrat biakan. Hal ini juga didukung dari data nilai aktivitas enzim yang lebih kecil dibanding nilai yang dihasilkan dari enzim murni. Beltagy *et al.*, (2004) menunjukkan aktivitas spesifik enzim protease yang diekstrak dari saluran pencernaan ikan nila menunjukkan peningkatan aktivitas spesifik ketika enzim tersebut sudah dimurnikan. Dari ekstrak kasar sebesar 0,06 U/mg menjadi 1,10 U/mg setelah dilakukan pemurnian melalui gel filtrasi.

4.1.3 Penentuan V_{maks} dan K_m

Hasil penelitian kami menunjukkan bahwa nilai V_{maks} dan K_m pada protease ekstrak khamir laut adalah $15,57 \text{ mM min}^{-1}$ dan $7,187 \times 10^3 \text{ mM}$ (perhitungan Lampiran 2). Nilai ini dapat menjelaskan bahwa pada kelajuan yang maksimum ($V_{max} = 15,57 \text{ mM min}^{-1}$), semua sisi aktif enzim akan berikatan dengan substrat, dan jumlah kompleks ES (Enzim Substrat) adalah sama dengan jumlah total enzim yang ada. Sedangkan jumlah substrat yang diperlukan untuk mencapai nilai kelajuan reaksi tertentu diekspresikan oleh konstanta Michaelis-Menten (K_m), yang merupakan konsentrasi substrat yang diperlukan oleh suatu enzim untuk mencapai setengah kelajuan maksimumnya. Nilai K_m yang didapat sebesar

7,187 x 10³ mM dimana nilai ini dapat menunjukkan seberapa kuatnya pengikatan substrat ke enzim (Ellis, 2001).

Nilai kecepatan reaksi maksimum (V_{maks}) yang diperoleh rendah sedangkan nilai K_m tinggi bila dibandingkan dengan penelitian Chi, *et al.*, (2009) yaitu pada ekstrak murni khamir laut *Aurobasidium pullulans* strain 10 yang memiliki V_{maks} sebesar 28,6 mM min⁻¹ dan K_m sebesar 0.25 mg/ml. Hal ini disebabkan karena protease ekstrak khamir laut yang digunakan belum dilakukan pemurnian. Ketaren (1990), menjelaskan bahwa kinetika reaksi enzimatik sangat dipengaruhi oleh kemurnian substrat. Apabila substrat tidak murni, maka kinetika enzimatik akan berjalan lamban atau terhambat.



Gambar 6. Grafik V_{maks} dan K_m

4.2 Karakteristik Hidrolisis Kepala Ikan Peperek

Kapasitas hidrolisis kepala ikan peperek meliputi DH (derajat hidrolisis), berat molekul (SDS PAGE) dan profil asam amino (HPLC) dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Karakteristik Hidrolisis Kepala Ikan Peperek

| Derajat Hidrolisis (%) | | | | |
|----------------------------------|---------------------|--------------------|---------|-------|
| 0 | 25 | 50 | 75 | 100 |
| menit | menit | menit | menit | menit |
| 25,5 | 32,77 | 35,3 | 42,06 | 44,33 |
| % | | | | |
| Sebelum Hidrolisis | | Setelah Hidrolisis | | |
| 47,63 | | 47,63 | | |
| 25,5 | | 25,5 | | |
| 18,66 | | 18,66 | | |
| | | 9,48 | | |
| Profil Asam Amino (per 100 gram) | | | | |
| Asam Amino | Hidrolisat | | Protein | |
| | Kepala Ikan Peperek | | | |
| Aspartat | 0.042688 | | | |
| Glutamat | 0.052401 | | | |
| Serin | 0.01251 | | | |
| Histidin | 0.036851 | | | |
| Glisin | 0.019188 | | | |
| Arginin | 0.012516 | | | |
| Alanin | 0.011368 | | | |
| Valin | 0.020385 | | | |
| Fenilalanin | 0.012488 | | | |
| Isoleusin | 0.010209 | | | |
| Leusin | 0.018127 | | | |
| Lisin | 0.084464 | | | |

4.2.1 DH (Derajat Hidrolisis)

Hidrolisis protein kepala ikan peperek dengan protease ekstrak khamir laut dengan waktu hidrolisis yaitu 0, 25, 50, 75 dan 100 menit diperoleh persentase masing-masing DH sebesar 25,5 % ; 32,77 % ; 35,3 % ; 42,06 % dan 44,33 % dari sini dapat diketahui bahwa semakin lama waktu hidrolisis maka % DH akan

meningkat juga (Lampiran 3). Hasil DH yang diperoleh menunjukkan bahwa protease ekstrak khamir laut mempunyai kemampuan untuk menghidrolisis kepala ikan peperek yang ditunjukkan dengan dibebaskannya nitrogen pada substrat. Bila dibandingkan dengan penelitian Sathivel *et al.*, (2003), pada kepala ikan herring (*Clupea harengus*) yang dihidrolisis secara enzimatik menggunakan alkalase diperoleh DH sebesar 18,3 % setelah 75 menit. Batista *et al* (2009), menghidrolisis *by product* ikan scabbard hitam (terdiri dari kepala, kulit, visceral dan tulang) memiliki nilai derajat hidrolisis 57 %.

Penelitian Bhaskar *et al.*, (2007), hidrolisat protein ikan dari visceral ikan *Catla catla* dengan bahan penghidrolisis alkalase memiliki derajat hidrolisis tinggi yaitu sebesar 50 % pada waktu ekstraksi lebih singkat (135 menit). Hal ini dapat disebabkan karena alkalase yang digunakan sudah dimurnikan sedangkan protease yang digunakan untuk menghidrolisis kepala ikan peperek merupakan ekstrak khamir laut. Data ini didukung dengan nilai aktivitas spesifik enzim yang relatif lebih rendah dibandingkan enzim alkalase ekstrak khamir laut yang sudah dimurnikan.

Berdasarkan kurva DH diperoleh DH maksimum sebesar 96,3 % dengan waktu hidrolisis 191 menit, waktu ini menandakan bahwa enzim sudah jenuh dalam menghidrolisis substrat dan proses hidrolisis berhenti. Persentase derajat hidrolisis dari bagian kepala mengalami peningkatan sebanding dengan lama (waktu) hidrolisis yang diperlukan. Hal ini disebabkan karena aktivitas enzim dari ekstrak khamir laut menghidrolisis ikatan peptida pada substrat (kepala ikan peperek) yang disebut sebagai fase cepat awal. Setelah melewati fase cepat awal (*initial rapid phase*) hidrolisis, tingkat hidrolisis akan cenderung menurun, yaitu masuk pada fase statis (*stationary phase*).

Nilai DH yang diperoleh sangat tinggi dan waktu yang sangat lama untuk menghidrolisis bila dibandingkan dengan penelitian Jaziri (2010) hidrolisis daging

ikan peperek yang memiliki nilai DH tertinggi sebesar 22,55 %. Hal ini diduga karena terikutnya bagian daging dan visceral saat pemotongan bagian kepala sehingga protease ekstrak kasar khamir laut bekerja secara maksimal, selain itu karena kepala ikan peperek mempunyai bagian yang cukup kompleks yaitu terdiri dari tulang, insang, otot, mata dan kulit.. Arnesen and Gildber (2009) menyatakan bahwa kepala ikan cod memiliki *raw material* yang kompleks yaitu terdiri dari otot 45 %, daging 12 %, 3 % visceral, tulang 20 %, insang 15 % , kulit 5 % and mata 4 % , memiliki nilai rata-rata protein sebesar 15 %.

Ariyani (2003) menyatakan bahwa derajat hidrolisis diukur dari perbandingan α -amino nitrogen dengan total nitrogen (AN/TN), maka dengan semakin tinggi tingkat pemecahan protein menjadi senyawa berantai pendek termasuk senyawa α -amino nitrogen, derajat hidrolisisnya menjadi semakin tinggi. Dan sebaliknya semakin kecil tingkat pemecahan protein menjadi senyawa berantai pendek, derajat hidrolisisnya menjadi semakin rendah. Selain itu, waktu yang digunakan untuk menghidrolisis kepala ikan peperek ini lebih lama dibandingkan waktu hidrolisis ikan peperek utuh dan daging ikan peperek yaitu 191 menit karena nilai DH juga dipengaruhi oleh lamanya kontak antara enzim dengan substrat (kepala) pada kondisi optimal kerja enzim. Meskipun demikian pada kondisi tertentu kerja enzim mencapai maksimum dan tidak mampu melakukan pemecahan lebih lanjut.

Nilai DH sangat berhubungan dengan K_m enzim yang menghidrolisis. Nilai K_m yang diperoleh pada penelitian ini tinggi yaitu sebesar $7,187 \times 10^3$ mM dan DH yang diperoleh yaitu 96,3 % dengan waktu hidrolisis 191 menit. Tardioli *et al.* (2005) melaporkan bahwa tiga perlakuan hidrolisis polipeptida yang dikatalisis oleh alkalase pada suhu 50°C dan pH 9.5, memiliki nilai (DH 10%, K_M 5.5 ± 1.0 mM; DH 15%, K_M 4.9 ± 0.4 mM; dan DH 20%, K_M 4.0 ± 0.8 mM), artinya jika nilai K_m tinggi maka yang DH diperoleh rendah. Menurut Segel (1976), K_m dapat

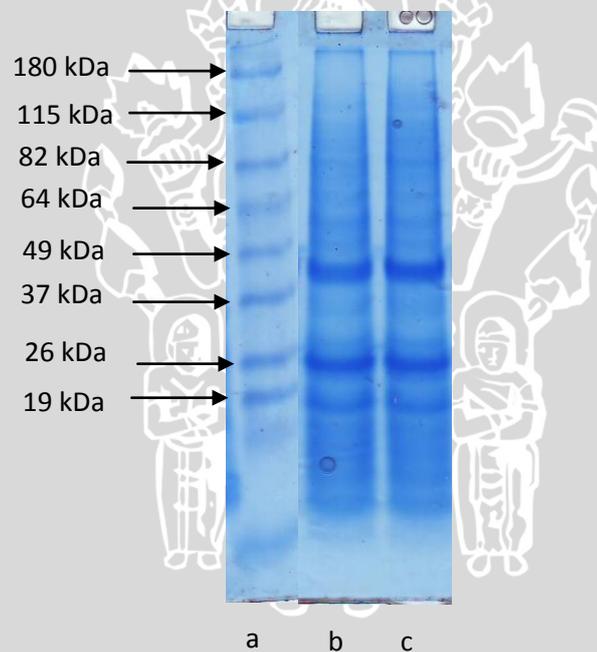
mengindikasikan kesesuaian relatif suatu substrat dari enzim tertentu. Sehingga substrat dengan K_m paling rendah mempunyai kemampuan untuk mengikat enzim paling tinggi.

4.2.2 Analisa Berat Molekul (SDS PAGE)

Untuk mengetahui efek hidrolisis enzim protease ekstrak dari khamir laut maka sampel dilakukan analisa SDS-PAGE (Aguilar *et al.*, 2007). Penentuan berat molekul dilakukan dengan teknik SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfat-Poliakrilamida Gel Elektroforesis*), yang merupakan metode yang sudah digunakan secara luas. Pada mekanisme SDS PAGE, protein bereaksi dengan SDS yang merupakan deterjen anionik membentuk kompleks yang bermuatan negatif. Protein akan terdenaturasi dan terlarut membentuk kompleks berikatan dengan SDS, berbentuk elips atau batang, dan berukuran sebanding dengan berat molekul protein. Protein dalam bentuk kompleks yang bermuatan negatif ini terpisahkan berdasarkan muatan dan ukurannya secara elektroforesis di dalam matriks gel poliakrilamid. Berat molekul protein dapat diukur dengan menggunakan protein standar yang telah diketahui berat molekulnya. Berdasarkan hasil analisis SDS-PAGE pada sampel sebelum dihidrolisis terdapat 3 pita dominan yaitu 47,63 kDa ; 25,5 kDa dan 18,66 kDa sedangkan sampel sesudah hidrolisis terdapat 4 pita dominan yaitu 47,63 kDa ; 25,5 kDa ; 18,66 kDa dan 9,48 kDa (Gambar 6).

Melihat karakteristik protease yang diekstrak dari khamir laut, dimana mempunyai derajat hidrolisis sebesar 96,3 % selama 191 menit waktu ekstraksi, mampu menghidrolisis sampel menjadi peptida dengan berat molekul paling rendah yaitu sebesar 9,84 KDa. Hal ini menunjukkan bahwa telah terjadi proses hidrolisis selama penambahan ekstrak protease khamir laut, sehingga memecah ikatan peptida menjadi peptida yang memiliki berat molekul lebih rendah. Batista *et al* (2009), menghidrolisis *by product* ikan scabbard hitam (terdiri dari

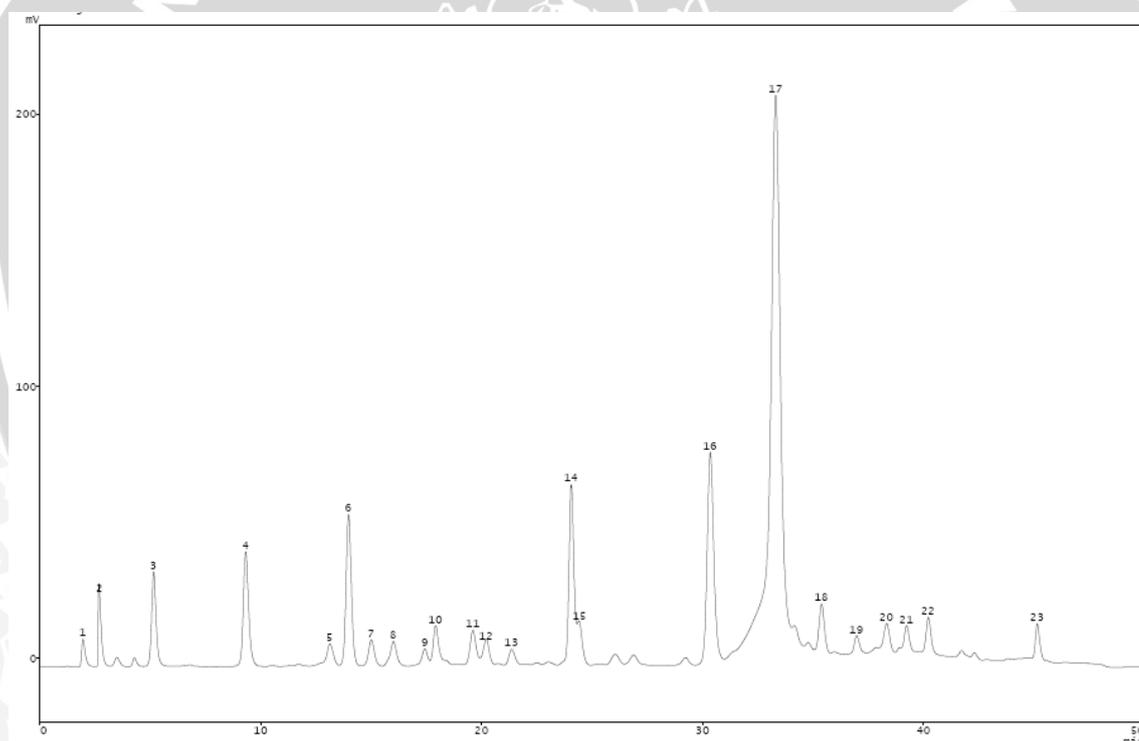
kepala, kulit, visceral dan tulang) memiliki nilai berat molekul sangat rendah yaitu 1000 Da. Bhaskar *et al.*, (2007) mampu mendapatkan hidrolisat protein dengan berat molekul dibawah 8 kDa dengan menggunakan alkalase, alkalase yang digunakan memiliki derajat hidrolisis yang lebih tinggi yaitu sebesar 50 % pada waktu ekstraksi lebih singkat (135 menit). Aguilar *et al.*, (2007), kemampuan suatu enzim untuk menghidrolisis peptida menjadi berat molekul lebih rendah dipengaruhi dengan derajat hidrolisis yang dimiliki enzim tersebut. Sebagai hidrolisat protein ikan yang memiliki nilai nutrisi yang tinggi, dapat dilihat bahwa protein tersebut harus mengandung banyak peptida yang memiliki berat molekul asam amino serendah mungkin (Vijayalakshmi *et.al*, 1986).



Gambar 7. Profil Berat Molekul Hidrolisis Protein Kepala Ikan Peperek
a) Standar SDS PAGE, b) Sampel sebelum dihidrolisis, dan c) sampel setelah dihidrolisis

4.2.3 Profil Asam Amino (HPLC)

Analisa profil asam amino ini menggunakan standart sebanyak 14 macam yaitu asam aspartat, asam glutamat, serin, glisin, histidin arginin, alanin, tirosin, metionin, valin, fenilalanin, isoleusin, leusin, dan lisin. Jenis asam amino yang terdapat dalam hidrolisat protein kepala ikan peperek dapat dilihat pada Tabel 5. Dalam hasil kromatogram terdapat 14 lebih peak, untuk menentukan peak tiap-tiap asam amino maka harus disesuaikan dengan *retention time* pada standart. Hal ini sesuai dengan Riyadi (2009), yang menyatakan bahwa untuk mengetahui peak mana yang merupakan milik analat (zat target analisa) kromatogram dibandingkan dengan kromatogram standart.



Gambar 8. Profil Asam Amino pada hidrolisat protein kepala ikan peperek

Tabel 5. Profil Asam Amino pada hidrolisat protein kepala ikan peperek (dalam gram asam amino/100 gram bahan uji)

| Jenis Asam Amino | Skor asam amino sampel (%) | Skor asam amino sampel berdasarkan NRC (%) | Skor asam amino sampel berdasarkan FAO/WHO (%) |
|------------------|----------------------------|--|--|
| Aspartat | 0.042688 | - | - |
| Glutamat | 0.052401 | - | - |
| Serin | 0.01251 | - | - |
| Histidin | 0.036851 | 0.017548 | 0.018425 |
| Glisin | 0.019188 | - | - |
| Arginin | 0.012516 | 0.009554 | 0.002503 |
| Alanin | 0.011368 | - | - |
| Tirosin | - | - | - |
| Metionin | - | - | - |
| Valin | 0.020385 | 0.005663 | 0.003761 |
| Fenilalanin | 0.012488 | 0.001921 | 0.002911 |
| Isoleusin | 0.010209 | 0.004084 | 0.002552 |
| Leusin | 0.018127 | 0.005493 | 0.00259 |
| Lisin | 0.084464 | 0.014818 | 0.015357 |
| Threonine | - | - | - |
| Triptofan | - | - | - |

Hasil analisa profil asam amino hidrolisat protein kepala ikan peperek terdeteksi sebanyak 12 asam amino yaitu aspartat, glutamat, serin, histidin, glisin, arginin, alanin, valin, fenilalanin, isoleusin, leusin dan lisin. Presentase asam amino yang diperoleh sangat kecil dibandingkan referensi dari NRC yang merupakan referensi kebutuhan asam amino esensial untuk ikan dan FAO/WHO yang merupakan referensi kebutuhan asam amino esensial bagi manusia. Skor asam amino yang baik adalah sama dengan atau diatas 1 sedangkan hasil yang didapat jauh dibawah 1, jadi protease ekstrak khamir laut tidak berhasil menghasilkan hidrolisat protein kepala ikan peperek yang mempunyai kualitas baik sebagai pakan maupun pangan.

Hasil profil asam amino diatas berbeda jauh bila dibandingkan dengan penelitian Sathivel *et al.*, (2003), hidrolisat protein kepala ikan hering memiliki 17 asam amino dan nilainya sesuai dengan rekomendasi dari FAO/WHO untuk

orang dewasa. Hal ini disebabkan karena protease ekstrak khamir laut belum dimurnikan sehingga hasil yang diperoleh tidak sesuai. Kandungan asam aminonya dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel. 6 Kandungan Asam Amino Hidrolisat Protein Kepala Ikan Hering

| Asam Amino | Kandungan |
|---------------|-----------|
| Cystein | 11,1 |
| Asam aspartat | 89,2 |
| Thereonin | 40,4 |
| Serin | 45,3 |
| Asam glutamat | 145,1 |
| Prolin | 58,9 |
| Glysin | 95,0 |
| Alanin | 69,4 |
| Valin | 45,7 |
| Methionin | 33,1 |
| Isoleusin | 32,6 |
| Leusin | 71,2 |
| Tyrosin | 27,4 |
| Phenylalanin | 37,2 |
| Histidin | 18,9 |
| Lysin | 80,4 |
| Arginin | 73 |

Analisa hidrolisis protein kepala ikan peperek dengan protease ekstrak khamir ini dikondisikan pada pH dan suhu akalin protease murni yaitu pH 9 dan suhu 45 °C. Metode yang digunakan berdasarkan penelitian Ping *et al.*, (2006), yang menyatakan bahwa strain khamir laut menghasilkan alkalin protease dengan aktivitas tertinggi pada pH 9 dan suhu 45 °C. Rao, *et al.*, (1998), alkalin protease termasuk dalam golongan endopeptidase. Endopeptidase terdapat dibagian *inner* dalam rantai polipeptida dimulai dari N dan C dan memotong sisi karboksil dari tirosin, fenilalanin dan leusin.

Berdasarkan hasil HPLC yang diperoleh asam amino tirosin, fenilalanin dan leusin memiliki nilai yang rendah dibanding asam amino yang lain. Padahal seharusnya tirosin, fenilalanin dan leusin memiliki nilai yang tinggi karena sifat dari alkalin protease memotong ikatan karboksil pada asam-asam amino

tersebut. Hal ini berkaitan dengan sisi aktif dari suatu enzim pada saat pengkondisian pH maupun suhu yang digunakan dimungkinkan pH dan suhu yang digunakan tidak sesuai dengan sifat karakteristik enzim sehingga kerja enzim tidak optimal. Hasil ini didukung dengan hasil analisa berat molekul dengan menggunakan SDS PAGE, hanya ada penambahan satu pita dan hanya mampu menghidrolisis sampel hingga 9,48 kDa.

Pada hidrolisis kepala ikan peperek memiliki profil asam amino lebih beragam yaitu 12 jenis asam amino dan bila dibandingkan dengan penelitian Ahmad (2010), hidrolisis ikan peperek utuh dengan ekstrak kasar khamir laut, profil asam aminonya hanya 10 jenis asam amino saja yaitu histidin, arginin, metionin, valin, fenilalanin, isoleusin, leusin, lisin, threonine, triptofan. Menurut Arnesen dan Gildberg (2009), kepala ikan mempunyai asam amino yang cukup kompleks seperti tryptophan, threonin, isoleusin, leusin, lysine, methionin, cystin, phenylalanin, tyrosin, valin, arginin, histidin, alanin, asam aspartat, asam glutamat, glisin, prolin, serin, hydroxyprolin.

Hal ini menunjukkan bahwa protease ekstrak khamir laut saat proses hidrolisis mampu memecah asam-asam amino dalam ikatan peptida protein kepala ikan peperek lebih banyak karena waktu hidrolisis lebih lama dan diduga disebabkan juga karena terikutnya daging dan visceral saat pemotongan kepala. Ditinjau juga dari nilai Derajat Hidrolisis yang tinggi, sehingga pemutusan ikatan peptida pada protein kepala ikan peperek yang dilakukan oleh ekstrak kasar khamir laut masih lebih tinggi.

5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang telah dilaksanakan dapat diambil kesimpulan sebagai berikut :

- Karakteristik protease yang diekstrak dari khamir laut mempunyai konsentrasi 2,217 ppm, aktivitas enzim masih sangat kecil yaitu sebesar 21,50 mU/ml, nilai V_{maks} sebesar $15,57 \text{ mM min}^{-1}$ dan K_m sebesar $7,187 \times 10^{-3} \text{ mM}$
- Kapasitas hidrolisis protease yang didapat dari ekstrak khamir laut memiliki derajat hidrolisis optimum sebesar 96,3 % pada waktu hidrolisis selama 191 menit, mampu memecah peptida menjadi berat molekul berkisar antara 47,63 – 9,48 kDa. Hasil analisa profil asam amino hidrolisat protein kepala ikan peperek terdeteksi sebanyak 12 asam amino yaitu aspartat, glutamat, serin, histidin, glisin, arginin, alanin, valin, fenilalanin, isoleusin, leusin dan lisin. Presentase asam amino yang diperoleh sangat kecil dibandingkan referensi dari NRC yang merupakan referensi kebutuhan asam amino esensial untuk ikan dan FAO/WHO yang merupakan referensi kebutuhan asam amino esensial bagi manusia.

5.2 Saran

Dari serangkaian penelitian yang telah dilakukan, maka disarankan sebagai berikut :

- Perlu adanya penelitian mengenai purifikasi enzim protease dari khamir laut secara lebih lanjut, sehingga mampu menghidrolisis protein menjadi asam amino yang layak untuk digunakan dalam bidang pangan.

- Perlu adanya penelitian mengenai faktor-faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim agar hasil yang ddiperoleh dapat menunjang nilai karakteristik protease ekstrak khamir laut sehingga diperoleh karakteristik hidrolisat protein kepala ikan peperek yang layak dalam bidang pangan maupun pakan.



DAFTAR PUSTAKA

- Adam, M. R. and M.O. moss. 2000. *Food Microbiology*. Second Edition. The Royal Society of Chemistry. Ombrigde.UK
- Adawiyah, R. 2007. *Pengolahan dan Pengawetan Ikan*. Bumi Aksara. Jakarta
- Arnessen, J.A dan Gildberg, A. 2009. *Extraction of muscle proteins and gelatine from cod head*. Norwegian Institute of Fisheries and Aquaculture Research, N-9291 Tromso, Norway
- Aisyah. 2008. *Asam amino*. <http://rgmaisayah.wordpress.com>. Diakses Pada Tanggal 02 Juni 2005 Pukul 19.00 WIB
- Akhdiya. A. 2003. *Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Protease Alkalin Termostabil*. Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Bogor. Buletin Plasma Nutfah Vol.9 No.2 Th.2003
- Almatsier, S. 2002. *Prinsip Dasar Ilmu Gizi*. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta
- Ariyani, F ; M. Saleh ;Tazwir dan N Hak. 2003. *Optimasi Proses Produksi Hidrolisat Protein Ikan (Hpi) Dari Mujair (Oreochromis mossambicus)*. Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia Volume 9 Nomor 5 Tahun 2003
- Batista I; C. Ramos; J. Coutinho; N.M. Bandarra dan M.L. Nunes.2009. *Characterization of protein hydrolysates and lipids obtained from black scabbardfish (Aphanopus carbo) by-products and antioxidative activity of the hydrolysates produced*. INRB/IPIMAR, Av. Brasí'lia, 1449-006 Lisbon, Portugal
- Bhaskar, N and N.S. Mahendrakar. 2008. *Protein Hydrolysate from Visceral Waste Proteins of Catla (Catla catla): Optimization of Hydrolysis Conditions for a Comercial Neutral Protease*. Bioresource Technology 99 (2008) 4105-4111
- Beltagy, A.L ; T.A El Adawy ; E.H. Rahman and A.A El-Bedawey. 2003. *Purification and Characterization of an Acidic Protease from the Viscera of Bolti Fish (Tilapia Nilotica)*. Food Science and Technology Department. Egypt
- BPS. 1992. *Konsumsi dan Kalori Protein Penduduk Indonesia dan Propinsi 1990*. BPS, Jakarta
- Bradford, MM. 1976. *a Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Protein Utilization*. The principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72:248-254
- Chi.Z; Z. Chi; T. Zhang; G.Liu; J. Li dan X. Wang. 2009. *Production, Characterization and Gene Cloning Of The Extracellular Enzymes From The Marine-Derived Yeasts and their Potential Applications*. Biotechnology Advances 27 (2009) 236–255

Chi.Z; Z; C. Ma, P. Wang, H.F. Li. 2006. *Optimization of medium and cultivation conditions for alkaline protease production by the marine yeast Aureobasidium pullulans*. Bioresource Technology Vol.98, (534–538)

Direktorat Jendral Perikanan. 1994. *Buku Pedoman Pengenalan Sumber Perikanan Laut (Jenis-Jenis Ikan Ekonomis Penting)*. Departemen Pertanian, Jakarta

FAO-WHO/UN. 1972. *Specifications For The Identity And Purity Of Some Enzymes And Certain other substances*. Fifteenth Report Of The Joint Fao/Who Expert Committee on Food Additives. Fao Nutrition Meeting Report Series no. 50b; Wld. Hlth. Org. Tech. Rep. Ser., 1971, no.488. Rome: Food And Agriculture Organization of the United Nations World Health Organization

Fersht, A. 1985. *Enzyme structure And Mechanism, Second Edition*. New York: W. H. Freeman and Company

Giyatmi. 2001. *Prospek Hidrolisat Protein ikan sebagai Pemer kaya Nutrisi Makanan*. Makalah. Program Pasca Sarjana. Institute Pertanian. Bogor. www.hayati-ipb.com . diakses tanggal 5 Desember 2009

Hadiwiyoto, S. 1993. *Teknologi Pengolahan Hasil Perikanan Jilid I*. Liberty, Yogyakarta

Kimura, S and T.Peristiwady. 2009. *Leiognathidae*. www.research.kahaku.go.jp. Diakses pada tanggal 10 Mei 2009 pukul 16.00 WIB

Kinsella, J.E. 1987. *Functional From Yeast Nucleoprotein For Food Uses*. In Food Biotechnology. Edited by D Knorr. Marcel Dekker, Inc New York

Kreger, V. R. 1984. *The Yeast a Toxonomic Study*. Third Revised dan Enlarged Edition. Elsevier Science Publisher BV. Amsterdam. 1082 PP.

Kristinsson, H. G. And Rasco, B. A. 2000. *Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and functional*. Critical Reviews in Food Science And Nutrition. 40(1):43-81. Crc press llc.

Lahl, W.J. and Braun, D.B. 1994. *Enzymatic Production Of Protein Hydrolysate For Food Use*. Food Technol- ogy : p. 69-71

Lowry O.H, Rosebrough N.J, Farr A.L, Randall R.J. (1951). *Protein measurement with the folin phenol reagent*. *Journal of Biological Chemistry*, 193-265

Ma et al., 2007 C.L. Ma, X.M. Ni, Z.M. Chi, L.Y. Ma and L.M. Gao. *Purification and characterization of an alkaline protease from the marine yeast Aureobasidium pullulans for bioactive peptide production from different sources*. *Mar Biotechnol* (2007), pp. 343–351

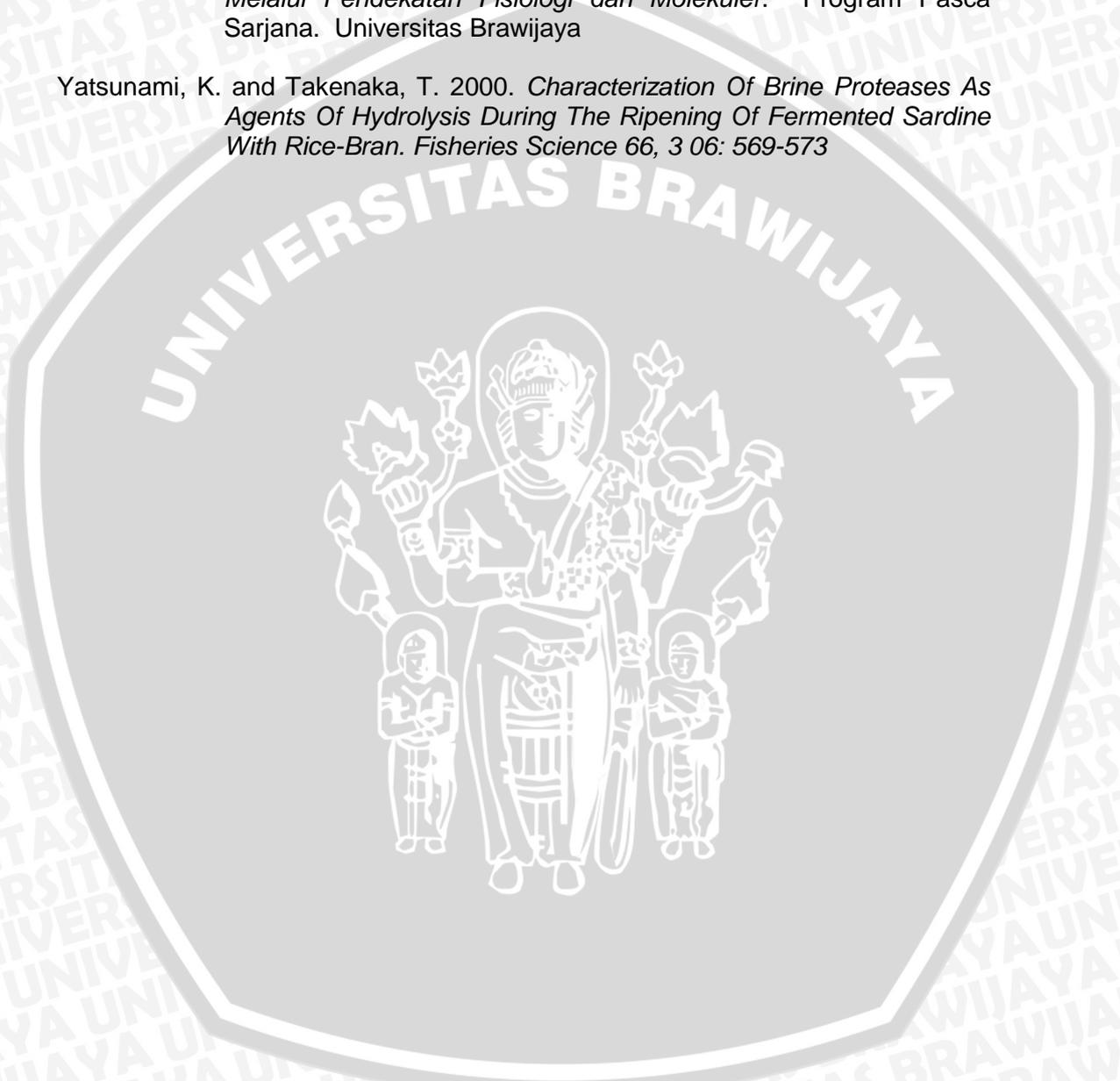
- Ni XM, Yue LX, Chi ZM, Li J, Wang XH, Madzak C. *Alkaline protease gene cloning from the marine yeast Aureobasidium pullulans HN2-3 and the protease surface display on Yarrowia lipolytica for bioactive peptide production*. Mar Biotechnol 2009;11:81–9
- Pelchar, MI. Dan Chan G.C.S. 1989. *Mikrobiologi Dasar*. Mc. Graww Hill Book Company. New York
- Pigot, G.M. dan B.W. Tucker. 1990. *Utility Fish Flesh Effectively While Maintaining Nutritional Qualities*. Seafood Effects of Technology on Nutrition. Marcel Decker, Inc., New York
- Ping, W., zheming, C., and M.A. Chunling. 2005. *Alkaline Protease Productions by a Strain of Marine Yeast*. Journal of Ocean University of China. ISSN 1672-5182, July 30, 2006, Vol.5, No.3, pp.263-268
- Poedjiadi, A. dan Supriyanti, T. 2006. *Dasar – Dasar Biokimia*. Universitas Indonesia Press. Jakarta
- Putranto W.S. 2006. *Purifikasi dan Karakterisasi Protease Yang Dihasilkan Lactobacillus acidophilus dalam Fermentasi Susu Sapi Perah*. Fakultas Peternakan Universitas Padjadjaran, Bandung. Disampaikan pada Seminar Nasional Bioteknologi “Capturing Opportunities through Biotechnology” Pusat Penelitian Bioteknologi – LIPI 15-16 November 2006
- Rao, M.B ; A.M. tanksale ; M.S.Ghatge and V.V.Deshpande. *Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases*. 1998. Microbiology and Molecular Biology Reviews. Vol. 62, No. 3
- Sathivel S., P.J. Bechtel, J. Babbitt, S. Smiley, C. Crapo, K.D. Reppond, and W. Prinyawiwatkul. 2003. *Biochemical and Functional Properties of Herring (Clupea harengus) Byproduct Hydrolysates*. Journal of Food Science—Vol. 68, Nr. 7, . www.ift.org
- Schimidi, M.K., S.L. Taylor, dan J.A. Nordlee. 1994. *Use of Hydrolysate-Based Products in Special Medical Diets*. J. of Food Technology, October 1994, p. 77-85
- Sediaoetama. 2004. *Ilmu Gizi*. Universitas Nasional. Jakarta
- Sitompul, S. 2004. *Analisa Asam Amino dalam Tepung Ikan dan Bungkil Kedelai*. Buletin Teknik Pertanian Vol. 9, Nomor 1. Bogor
- Shimuta et al. 2000. *Expresion And Secretion Of Schitalydopepsin b, And Acid Protease From Scytalidium Lignilocum, In Yeast*. Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry. 64:1542-1546
- Sulistiyati, T. D. 2001. *Protein pada Ikan*. Jurusan Perikanan. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya
- Walker,G.M. 1998. *Yeast Physiology and Biotechnology*. John Willey and Sons, Inc. United States Of Amerika

Whitaker, J. R. 1994. *Principles Of Enzymology For The Food Sciences, Second Edition*. New York: Marcel Dekker, Inc. Whitehead, peter j. P. 2007. *Sardinella*

Winarno, F.G. 1995. *Enzim pangan*. Garmedia Pustaka Utama. Jakarta

Wiyanto dan Sukoso. 2000. *Karakterisasi Khamir Laut Dari Perairan Jawa Timur Melalui Pendekatan Fisiologi dan Molekuler*. Program Pasca Sarjana. Universitas Brawijaya

Yatsunami, K. and Takenaka, T. 2000. *Characterization Of Brine Proteases As Agents Of Hydrolysis During The Ripening Of Fermented Sardine With Rice-Bran*. *Fisheries Science* 66, 3 06: 569-573

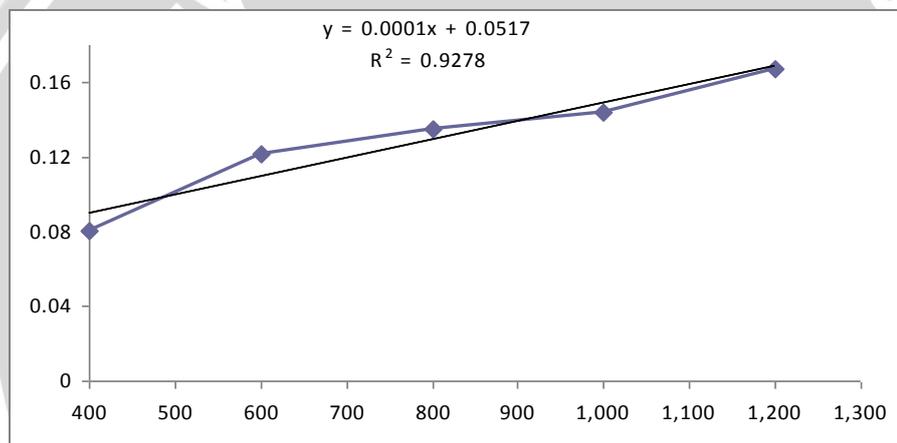


Lampiran 1. Perhitungan Konsentrasi Protein Sampel dengan Spektrofotometer

| | Ulangan | | Rata-rata |
|--------|---------|--------|-----------|
| | abs1 | abs2 | |
| sampel | 0,22 | 0,3269 | 0,2734 |

Hasil pembacaan standar protein BSA pada berbagai konsentrasi

| Konsentrasi | ABS 1 | ABS 2 | Rata-rata |
|-------------|--------|--------|-----------|
| 400 | 0,069 | 0,067 | 0,068 |
| 600 | 0,1271 | 0,1171 | 0,1221 |
| 800 | 0,1454 | 0,1244 | 0,1349 |
| 1000 | 0,1465 | 0,1423 | 0,1444 |
| 1200 | 0,1609 | 0,1732 | 0,16705 |



Hasil persamaan yang didapatkan dari kurva standar BSA yaitu :

$$y = 0,0001x + 0,0517$$

$$R^2 = 0,9278$$

Konsentrasi protein sampel yaitu :

$$y = 0,0001x + 0,0517$$

$$0,2734 = 0,0001x + 0,0517$$

$$0,2734 - 0,0517 = 0,0001x$$

$$X = 2,217 \text{ ppm}$$

Konsentrasinya adalah 2,217 ppm atau 22,17 mg/L

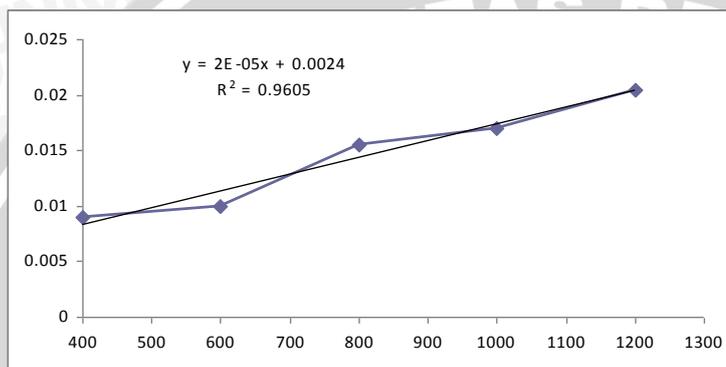
Jadi konsentrasi protein dalam sampel hidrolisat protein ikan peperek yaitu sebesar 2,217 mg/L.

Lampiran 2. Perhitungan V_{maks} dan K_m

Hasil spektrofotometri hidrolisat protein kepala ikan peperek

| Konsentrasi | Absorbansi |
|-------------|------------|
| 0.50% | 0.3301 |
| 0.25% | 0.1516 |
| 0.17% | 0.1082 |
| 0.13% | 0.0765 |
| 0.10% | 0.0637 |

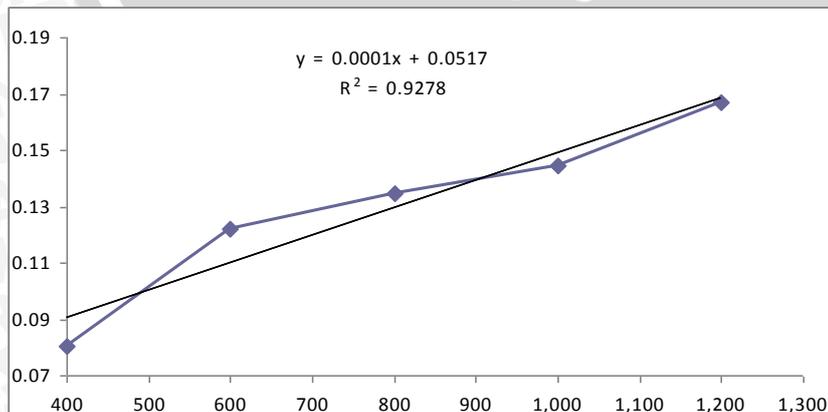
Untuk mendapatkan nilai $1/V$ digunakan persamaan kurva tirosin



Dari persamaan $y=0,00002x+0,002$ diperoleh :

| Konsentrasi (%) | ppm (mg/mL) | Pengenceran 100 x | V ($\mu\text{mol}/\text{menit}/\text{L}$) | $1/V$ ($\mu\text{mol}/\text{menit}/\text{L}$) |
|-----------------|-------------|-------------------|---|---|
| 0.50 | 16405 | 1640500 | 0.452702 | 0.002209 |
| 0.25 | 7480 | 748000 | 0.206413 | 0.004845 |
| 0.17 | 5310 | 531000 | 0.146531 | 0.006824 |
| 0.13 | 3725 | 372500 | 0.102793 | 0.009728 |
| 0.10 | 3085 | 308500 | 0.085132 | 0.011747 |

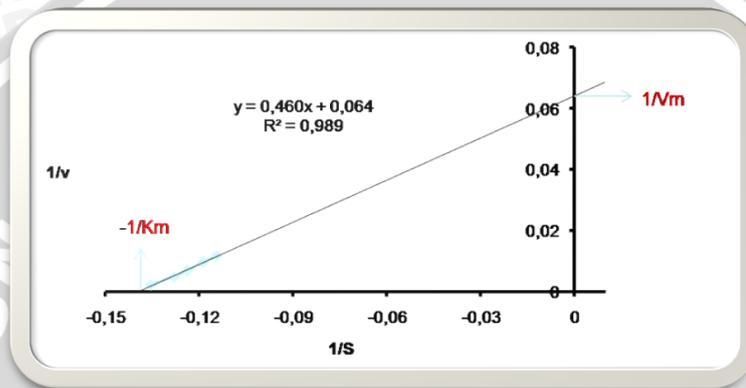
Untuk mendapatkan $1/S$ digunakan kurva BSA



Dari persamaan $y=0,0001x+0,0517$ diperoleh :

| Konsentrasi (%) | ppm (mg/mL) | Pengenceran 100 x | S (M) | 1/S (M) |
|-----------------|-------------|-------------------|--------------------------|----------|
| 0.50 | 16405 | 1640500 | 4.15522×10^{-8} | -0.13548 |
| 0.25 | 7480 | 748000 | 1.49104×10^{-8} | -0.12777 |
| 0.17 | 5310 | 531000 | 8.43284×10^{-8} | -0.12385 |
| 0.13 | 3725 | 372500 | 3.70149×10^{-8} | -0.1186 |
| 0.10 | 3085 | 308500 | 1.79104×10^{-8} | -0.11433 |

Dari hasil $1/V$ dan $1/S$ diatas maka dibuat grafik untuk mengetahui V_{maks} dan K_m



Berdasarkan persamaan yang diperoleh $y=0.4605x+0.0642$,maka :

Untuk mencari $-1/K_m$, $y = 0$

$$0 = 0,4605x + 0,0642$$

$$0.4605x = -0.0642$$

$$x = -0.13913$$

$$-1/K_m = -0.13913$$

$$K_m = 7,187 \text{ M} = 7,187 \times 10^3 \text{ mM}$$

Untuk mencari V_{maks} , $x=0$

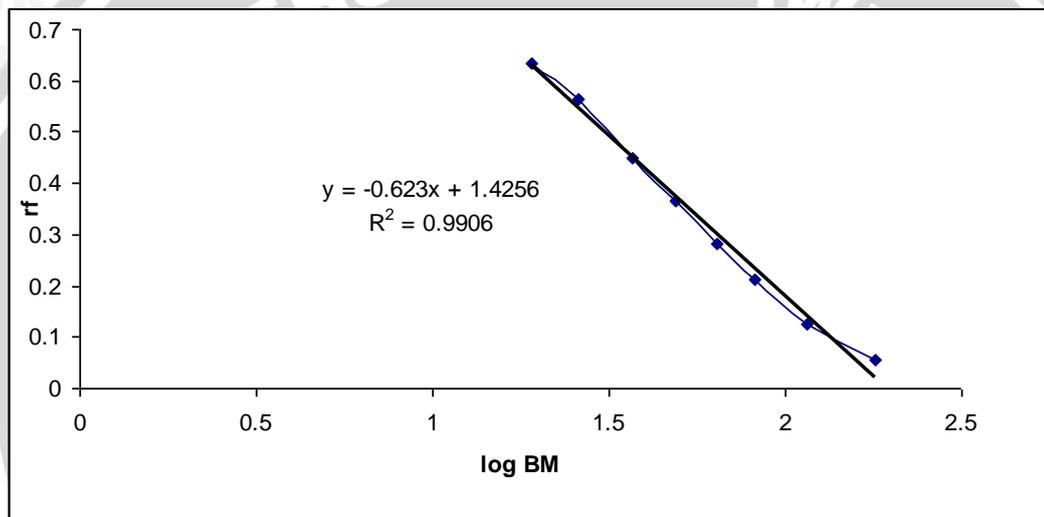
$$1/V_{maks} = 0,0642$$

$$V_{maks} = 15,57 \text{ mM min}^{-1}$$

Lampiran 3. Berat Molekul (SDS PAGE)

| BM (kDa) | Jarak tracking | log BM | rf |
|----------|----------------|------------|-------------|
| 180 | 4 | 2.25527251 | 0.056338028 |
| 115 | 9 | 2.06069784 | 0.126760563 |
| 82 | 15 | 1.91381385 | 0.211267606 |
| 64 | 20 | 1.80617997 | 0.281690141 |
| 49 | 26 | 1.69019608 | 0.366197183 |
| 37 | 32 | 1.56820172 | 0.450704225 |
| 26 | 40 | 1.41497335 | 0.563380282 |
| 19 | 45 | 1.2787536 | 0.633802817 |

Berdasarkan hasil diatas dibuat kurva sebagai berikut :



Dari persamaan $y = -0.623x + 1.4256$, diperoleh :

Sampel sebelum dihidrolisis :

| BM (kDa) | Jarak tracking | Log BM | rf IS |
|----------|----------------|-------------|------------|
| 47.62977 | 27 | 1.677878507 | 0.38028169 |
| 25.5028 | 39 | 1.406587842 | 0.54929577 |
| 18.66133 | 45 | 1.270942509 | 0.63380282 |

Sampel sesudah dihidrolisis :

| BM (kDa) | Jarak tracking | log BM | rf IS |
|-------------|----------------|-------------|-------------|
| 47.62977248 | 27 | 1.677878507 | 0.38028169 |
| 25.50279863 | 39 | 1.406587842 | 0.549295775 |
| 18.6613264 | 45 | 1.270942509 | 0.633802817 |
| 9.485151854 | 58 | 0.977044288 | 0.816901408 |

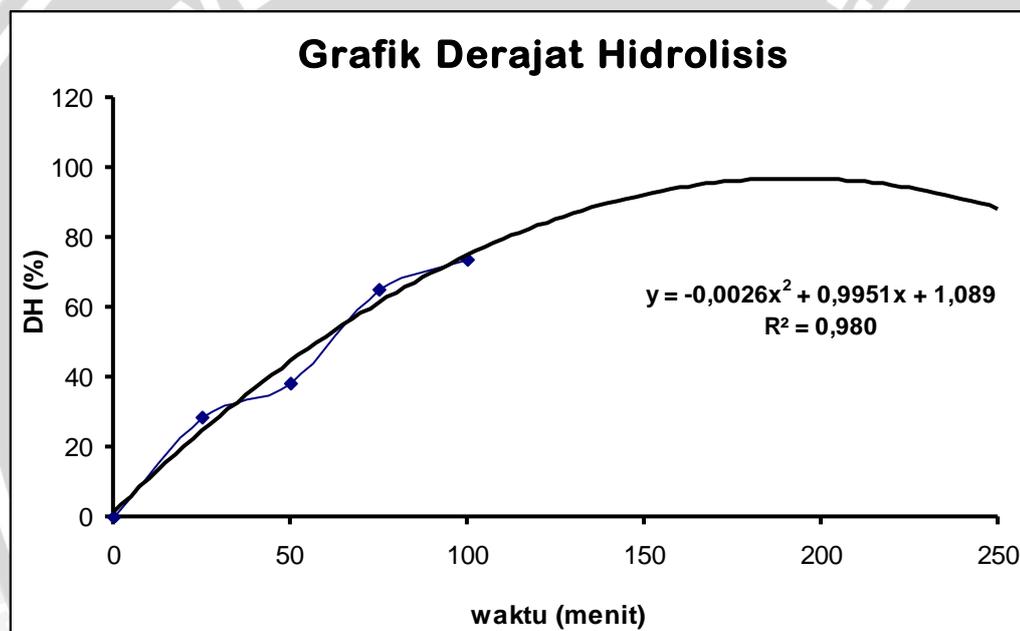
Lampiran 4. DH (Derajat Hidrolisis)

Rumus Perhitungan DH :

$$DH = \frac{N\ TCA}{N\ Total} \times 100$$

| Waktu | N TCA | N Total | % DH |
|-------|-------|---------|-------|
| 0 | 0,14 | 0,37 | 25,5 |
| 25 | 0,195 | 0,595 | 32,77 |
| 50 | 0,27 | 0,765 | 35,3 |
| 75 | 0,36 | 0,865 | 42,06 |
| 100 | 0,45 | 1,015 | 44,33 |

Grafik Derajat Hidrolisis :



Persamaan $y = -0,0026x^2 + 0,9951x + 1,0891$

diturunkan menjadi $y = -0,0052x + 0,9951$

bila $y = 0$

maka : $0 = -0,0052x + 0,9951$

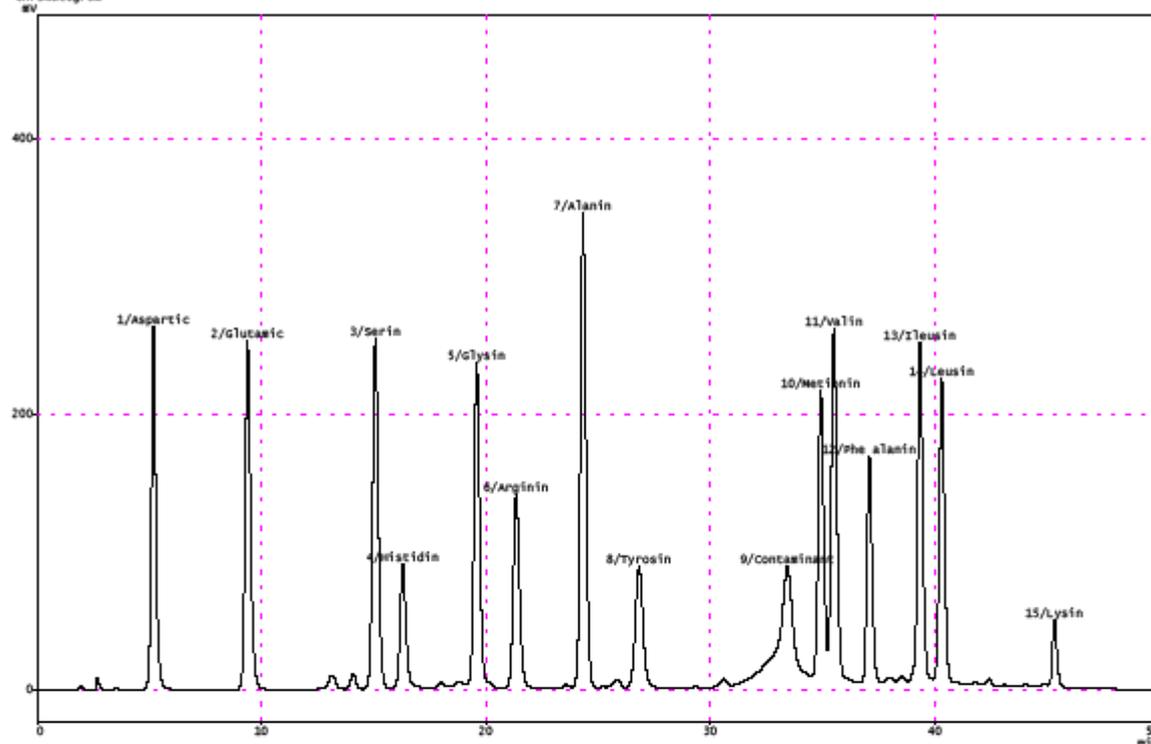
$$x = 191,3654$$

Sehingga waktu maksimum untuk menghidrolisis kepala ikan peperek dengan menggunakan protease ekstrak khamir laut adalah 191 menit.

Lampiran 5. Grafik Standar Asam Amino (HPLC)

CLASS-LC10 DATAA14.D01 09/03/20 01:34:50
 Sample : Standar AA 35.714 ppm
 Method Filename: ANINO.NET

*** Chromatogram ***



*** Peak Report ***

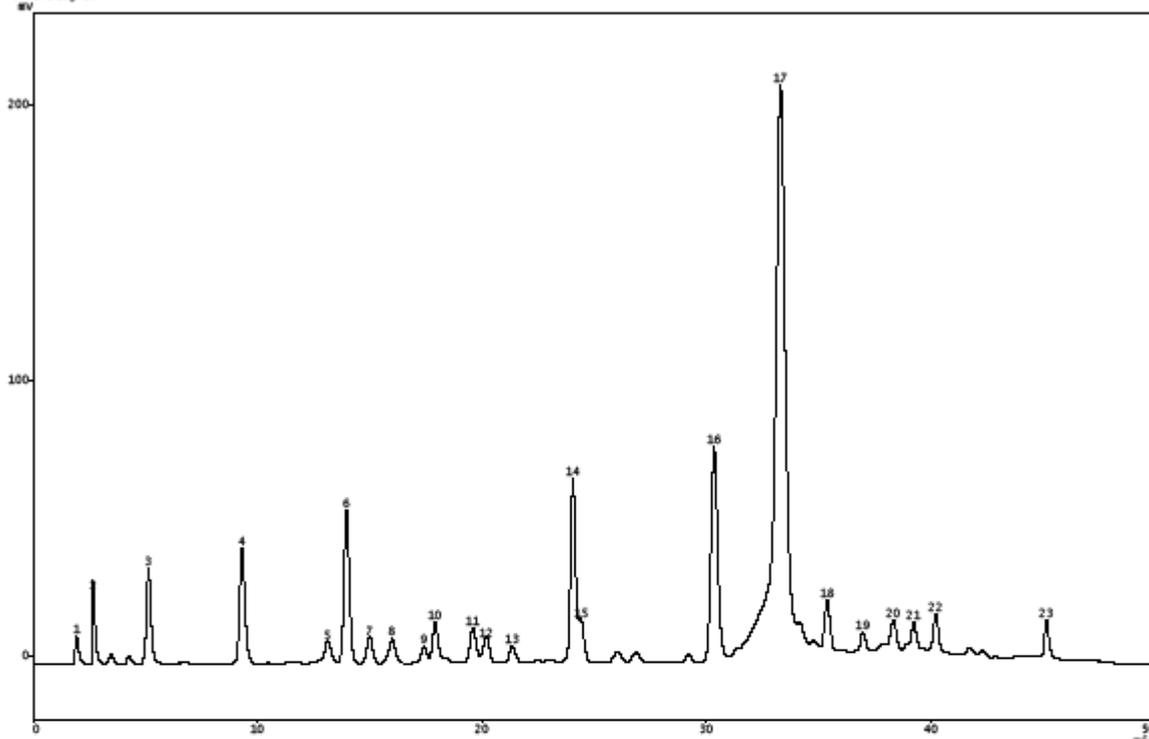
| PKNO | TIME | AREA | HEIGHT | CONC | NAME |
|------|--------|---------|--------|------|-------------|
| 1 | 5.182 | 3547052 | 261557 | | Aspartic |
| 2 | 9.374 | 4191984 | 251786 | | Glutamic |
| 3 | 15.066 | 4375020 | 232581 | | Serin |
| 4 | 16.290 | 1554790 | 88560 | | Histidin |
| 5 | 19.579 | 3949740 | 232591 | | Glysin |
| 6 | 21.340 | 2648790 | 138913 | | Arginin |
| 7 | 24.115 | 5848607 | 342717 | | Alanin |
| 8 | 26.816 | 1995144 | 86225 | | Tyrosin |
| 9 | 33.422 | 1750163 | 66098 | | Contaminant |
| 10 | 34.909 | 3503877 | 206969 | | Metionin |
| 11 | 35.495 | 4337227 | 232512 | | Valin |
| 12 | 37.070 | 2540559 | 162876 | | Phe alanin |
| 13 | 39.328 | 3713496 | 241678 | | Ileusin |
| 14 | 40.293 | 3495154 | 218283 | | Leusin |
| 15 | 45.314 | 626903 | 47567 | | Lysin |

48074275 2850912

Lampiran 6. Grafik Profil Asam Amino Hidrolisat Kepala Ikan Peperek

CLASS-LCID DATA=ANGGRAT_001 99/03/19 23:12:28
 Sample : Sampel I Angra
 ID :
 Method Filename: KORG.MET

*** Chromatogram ***



*** Peak Report ***

| PKID | TIME | AREA | HEIGHT | CONC |
|------|--------|----------|--------|----------|
| 1 | 1.945 | 113510 | 30004 | 0.0630 |
| 2 | 2.700 | 274703 | 28480 | 2.0837 |
| 3 | 5.142 | 484532 | 34358 | 3.6753 |
| 4 | 9.308 | 702928 | 41739 | 5.3318 |
| 5 | 13.123 | 133141 | 7258 | 1.0107 |
| 6 | 13.962 | 926148 | 59882 | 7.0257 |
| 7 | 14.994 | 175138 | 9540 | 1.3284 |
| 8 | 15.994 | 183247 | 8970 | 1.3907 |
| 9 | 17.414 | 83903 | 5257 | 0.6284 |
| 10 | 17.904 | 204082 | 13060 | 1.5480 |
| 11 | 19.591 | 242519 | 12542 | 1.8395 |
| 12 | 20.193 | 171109 | 9208 | 1.2979 |
| 13 | 21.245 | 108089 | 5867 | 0.8047 |
| 14 | 24.044 | 1038933 | 65543 | 8.0523 |
| 15 | 24.433 | 212686 | 15543 | 1.6133 |
| 16 | 30.337 | 1592086 | 76701 | 12.0761 |
| 17 | 33.297 | 5469897 | 194034 | 41.4900 |
| 18 | 35.374 | 282933 | 17201 | 2.1461 |
| 19 | 36.961 | 103519 | 6470 | 0.7700 |
| 20 | 38.319 | 170792 | 9775 | 1.2955 |
| 21 | 39.223 | 121137 | 8378 | 0.9198 |
| 22 | 40.208 | 202743 | 13115 | 1.3378 |
| 23 | 45.137 | 109444 | 12783 | 1.2853 |
| | | 15183639 | 660904 | 100.0000 |

Lampiran 7. Hasil Analisa Asam Amino

| Rt | Asam amino | Konsentrasi* (ppm) |
|------|-------------|--------------------|
| 5,1 | Aspartat | 4.87858 |
| 9,3 | Glutamat | 5.988689 |
| 15,0 | Serin | 1.429667 |
| 16,2 | Histidin | 4.211536 |
| 19,5 | Glisin | 2.192884 |
| 21,3 | Arginin | 1.430413 |
| 24,3 | Alanin | 1.299192 |
| 26,8 | Tirosin | - |
| 34,9 | Metionin | - |
| 35,4 | Valin | 2.329753 |
| 37,0 | Fenilalanin | 1.427219 |
| 39,3 | Isoleusin | 1.1668 |
| 40,2 | Leusin | 2.071658 |
| 45,3 | Lisin | 9.653045 |

Untuk mendapatkan * :

Rumus = (Area sampel/Area standar) x Konsentrasi standar

Konsentrasi standar : 35,714 ppm

Diketahui :

- Berat sampel uji sebesar 400 gram dilarutkan dalam 400 mL air, dihasilkan 700 mL supernatan
- Volume injeksi 20 μ L, maka
 1. Dalam volume 20 μ L mengandung 4,87858 μ g
 2. Dalam 1 ml mengandung 0,240929 μ g
 3. Dalam 700 mL mengandung 0,17 μ g
 4. Dalam 700mL atau dari 400 gram bahan mengandung 0,17 gram atau
 5. Dalam tiap gram bahan uji mengandung 0.00042688 atau
 6. Dalam 100 gram bahan mengandung 0.042688 gram asam aspartat

Berdasarkan asumsi diatas maka didapatkan hasil sebagai berikut :

| Jenis Asam Amino | Skor Asam Amino Sampel (%) | Skor Asam Amino Esensial NRC (%) | Skor Asam Amino Esensial FAO/WHO (%) | Skor Asam Amino Sampel Berdasarkan NRC (%) | Skor Asam Amino Sampel Berdasarkan FAO/WHO (%) |
|------------------|----------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|--|--|
| Aspartat | 0.042688 | - | - | - | - |
| Glutamat | 0.052401 | - | - | - | - |
| Serin | 0.01251 | - | - | - | - |
| Histidin | 0.036851 | 2.1 | 2 | 0.017548 | 0.018425 |
| Glisin | 0.019188 | - | - | - | - |
| Arginin | 0.012516 | 1.31 | 5 | 0.009554 | 0.002503 |
| Alanin | 0.011368 | - | - | - | - |
| Tirosin | - | - | - | - | - |
| Metionin | - | 3.1 | 3.5 | - | - |
| Valin | 0.020385 | 3.6 | 5.42 | 0.005663 | 0.003761 |
| Fenilalanin | 0.012488 | 6.5 | 4.29 | 0.001921 | 0.002911 |
| Isoleusin | 0.010209 | 2.5 | 4 | 0.004084 | 0.002552 |
| Leusin | 0.018127 | 3.3 | 7 | 0.005493 | 0.00259 |
| Lisin | 0.084464 | 5.7 | 5.5 | 0.014818 | 0.015357 |
| Threonine | - | 3.9 | 4 | - | - |
| Triptofan | - | 0.8 | 1.21 | - | - |

