

**KARAKTERISASI DIALISAT EKSTRASELULER KHAMIR LAUT
YANG DIDIALISIS DENGAN SELOFAN MWCO 25 kDa PADA pH 6,0
DAN APLIKASINYA DALAM PEMBUATAN HIDROLISAT PROTEIN IKAN
PEPEREK (*Leiognathus sp.*)**

SKRIPSI

**PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERIKANAN**

Oleh:

NUR FAJRIN NISA

NIM. 0710830044



FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2011

**KARAKTERISASI DIALISAT EKSTRASELULER KHAMIR LAUT
YANG DIDIALISIS DENGAN SELOFAN MWCO 25 kDa PADA pH 6,0
DAN APLIKASINYA DALAM PEMBUATAN HIDROLISAT PROTEIN IKAN
PEPEREK (*Leiognathus sp.*)**

SKRIPSI

**PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERIKANAN**

Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Meraih Gelar Sarjana

Oleh:

NUR FAJRIN NISA

NIM. 0710830044



FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2011

SKRIPSI

KARAKTERISASI DIALISAT EKSTRASELULER KHAMIR LAUT
YANG DIDIALISIS DENGAN SELOFAN MWCO 25 kDa PADA pH 6,0
DAN APLIKASINYA DALAM PEMBUATAN HIDROLISAT PROTEIN IKAN
PEPEREK (*Leiognathus sp.*)

Oleh :
NUR FAJRIN NISA
NIM. 0710830044

telah dipertahankan didepan penguji
pada tanggal 12 Juli 2011
dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui,

Dosen Pembimbing I

Dosen Penguji,

Prof. Ir. Sukoso, M. Sc. Ph. D

NIP. 19640919 198903 1 002

Dr. Ir. Happy Nursyam, MS

NIP. 19600322 198601 1 001

Dosen Pembimbing II

Dosen Penguji,

Ir. Muhamad Firdaus, MP

NIP. 19680919 200501 1 001

Ir. Dwi Setijawati, M. kes

NIP. 19611022198802 2 001

Mengetahui,
Ketua Jurusan

(Dr. Ir. Happy Nursyam, MS)

NIP : 19600322 198601 1 001

Tanggal :

RINGKASAN

NUR FAJRIN NISA Karakterisasi Dialisat Ekstraseluler Khamir Laut yang Didialisis dengan selofan MWCO 25 kDa pada pH 6 dan Aplikasinya dalam Pembuatan Hidrolisat Protein Ikan Peperek (*Leiognathus sp.*) (Dibawah bimbingan **Prof. Ir. SUKOSO, MSc. Ph.D** dan **Ir. MUH. FIRDAUS, MS**)

Khamir laut merupakan khamir yang diisolasi dari lingkungan laut dan dapat tumbuh dengan baik pada medium yang disiapkan dengan air laut dibandingkan pada medium yang disiapkan dengan air tawar. Chi *et al.*, (2009) telah menemukan jenis berbeda dari khamir laut, yang dapat menghasilkan macam – macam enzim *extracellular*, meliputi *amylase*, *protease alkalin*, *asam protease*, *phytase*, *lipase*, *inulinase* dan toksin pembunuh. Protease atau enzim proteolitik adalah enzim yang memiliki daya katalitik yang spesifik dan efisien terhadap ikatan peptide dari suatu molekul polipeptida atau protein. Protease merupakan jenis enzim esensial yang ada pada khamir, prokariot, tanaman dan hewan (Gupta *et al.*, 2002).

Metode isolasi enzim yang sering digunakan adalah ekstraksi, koagulasi, sentrifugasi, filtrasi, dan kromatografi (Susi, 2002). Pemisahan dilakukan sentrifugasi pada kecepatan dan gaya berat tertentu sehingga sel-sel mikroorganisme mengendap dan supernatant merupakan cairan yang berisi enzim (Rahayu, 1990). Metode – metode pemurnian enzim antara lain pengendapan, filtrasi membran, kromatografi adsorpsi, kromatografi afinitas dan filtrasi gel (Smith, 1993). Metode yang paling sering digunakan adalah pengendapan dengan konsentrasi garam bervariasi (Aulanni'am, 2005). Dialisis adalah teknik yang digunakan untuk memisahkan senyawa dengan BM-rendah dan senyawa BM-tinggi (*desalting*) melalui membrane semipermeabel.

Tabung dialisis dengan *molecular weight cutoff* (MWCO) 25 kDa dapat digunakan untuk memindahkan ion nitrogen, asam amino, atau peptida (Schmidt *et al.*, 2007). Sehingga 25 kDa MWCO dapat digunakan dalam proses dialisis protease khamir laut. Pemurnian dan karakterisasi protease gumpalan susu dari *Mucor pusillus* dilakukan dengan didialisis menggunakan buffer fosfat (0.02 M; pH 6.0) dalam suhu 4°C (Belall *et al.*, 2011). Semua reaksi enzimatik dipengaruhi oleh pH medium tempat reaksi terjadi (Martin *et al.*, 1987). Range dari buffer dapat digunakan dengan baik diantara pH 5,8 - 8,0. Fosfat mempunyai kapasitas penyanggaan yang sangat tinggi dan mempunyai kelarutan yang sangat tinggi dalam air (DeAngelis, 2007).

Menurut Penelitian Ahmad (2010), ekstrak kasar khamir laut mengandung enzim alkalik protease dengan nilai aktivitas 0,0097 U/mg. Aktivitas enzim ekstrak kasar khamir laut tersebut terbilang masih rendah dibandingkan dengan hasil penelitian Chi *et al.*, (2008), ekstrak murni khamir laut *Aurobasidium pullulans* strain 10 yang diisolasi dari laut china mempunyai nilai aktivitas protease 623,1U/mg ; 7,2 U/mg. Rendahnya nilai aktivitas dimungkinkan karena ekstrak yang diperoleh dari khamir laut masih belum dimurnikan (ekstrak kasar) sehingga perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan tahapan yang lebih murni.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui karakteristik protease ekstraseluler pada dialisat khamir laut dengan berat molekul >25 kDa yang didialisis dengan pH 6, meliputi aktivitas protease dialisat khamir laut, konsentrasi protease dialisat khamir laut, konstanta Michaelis-Menten (K_M) dan

kecepatan maksimal (V_{maks}). Selain itu untuk mengetahui kemampuan dialisat khamir laut dalam menghidrolisis ikan peperek meliputi DH (derajat hidrolisis), berat molekul (SDS-PAGE) dan profil asam amino (HPLC).

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksploratif. Penelitian eksploratif adalah jenis penelitian yang berusaha mencari ide-ide atau hubungan-hubungan yang baru (Umar, 1999).

Berdasarkan hasil penelitian yaitu karakteristik protease dialisat khamir laut mempunyai konsentrasi protein 65.5 mg/mL, aktivitas enzim 50 mU/mL, serta V_{maks} 0,080142653 mmol/min/mg, dan nilai K_M sebesar $0,653594771 \times 10^3$ mM. Hal ini menunjukkan bahwa enzim dari dialisat khamir laut memiliki nilai karakteristik yang lebih tinggi dibanding ekstrak kasar khamir laut, dimungkinkan karena dialisat khamir laut lebih murni. Sementara itu dialisat khamir laut dapat menghidrolisis ikan peperek secara optimal pada pH 6,4, 100 menit, suhu 44°C , dengan menghasilkan peptida 157,1036-4,097092 kDa dan 11 asam amino, asam amino esensial yang terdapat pada hidrolisat ikan peperek adalah histidin, metionin, valin, fenilalanin, isoleusin, leusin, dan lisin. Semua asam amino pada hidrolisat protein ikan yang dihidrolisis dengan dialisat khamir laut bila dibanding dengan referensi dari NRC yang merupakan referensi kebutuhan asam amino esensial untuk pakan dan FAO/WHO yang merupakan referensi kebutuhan asam amino untuk manusia mempunyai nilai 1 kecuali asam amino fenilalanin, treonin, dan triptofan sehingga apabila hidrolisat digunakan sebagai pakan atau pangan, maka bahan pangan atau pakan juga kekurangan 3 asam amino tersebut dengan demikian untuk memenuhi kebutuhan asam amino ikan dan manusia harus memasukkan fenilalanin, treonin, dan triptofan dari sumber lain.

Penelitian ini dapat disarankan perlu penelitian lebih lanjut tentang pemurnian protease dari khamir laut



KATA PENGANTAR

Dengan memanjatkan puji syukur kehadirat Allah SWT, atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya penulis dapat menyajikan tulisan laporan skripsi dengan judul “Karakterisasi Dialisat Ekstraseluler Khamir Laut yang Didialisis dengan Selofan MWCO 25 kDa pada pH 6 dan Aplikasinya dalam Pembuatan Hidrolisat Protein Ikan Peperek (*Leiognathus sp*)”. Penulis menyadari sepenuhnya bahwa laporan Skripsi ini tidak akan tersusun tanpa adanya bimbingan dan bantuan dari berbagai pihak, rasa hormat dan terima kasih penulis sampaikan kepada :

1. Bapak Prof. Ir. Sukoso, M. Sc. Ph. D selaku dosen pembimbing I, yang telah meluangkan waktunya untuk membimbing, mengarahkan dan memberi masukan bagi penulis.
2. Bapak Ir. Firdaus, MP selaku dosen pembimbing II, yang telah meluangkan waktunya untuk membimbing, mengarahkan dan memberi masukan bagi penulis.
3. Bapak Dr. Ir. Happy Nursyam, MS selaku dosen penguji yang telah meluangkan waktunya untuk member masukan.
4. Ibu Ir. Dwi Setijawati, M.kes selaku dosen penguji yang telah meluangkan waktunya untuk member masukan.
5. Bapak Sudomo, Ibu Kartikasari dan Bapak Darwin, selaku analis yang telah membantu menganalisis.
6. Semua pihak yang tidak mungkin penulis sebutkan satu persatu yang telah banyak membantu hingga skripsi ini dapat terselesaikan.

Semoga Allah SWT memberikan balasan yang berlipat atas semua bantuan dan dukungan yang diberikan. Akhirnya dengan segala kerendahan hati, penulis menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini masih banyak kekurangannya, Meskipun demikian penulis telah berusaha semaksimal mungkin dalam mengerjakannya. Harapan penulis semoga laporan skripsi ini dapat bermanfaat baik bagi penulis sendiri maupun bagi pembaca.

Malang, 8 Juli 2011

Penulis

DAFTAR ISI

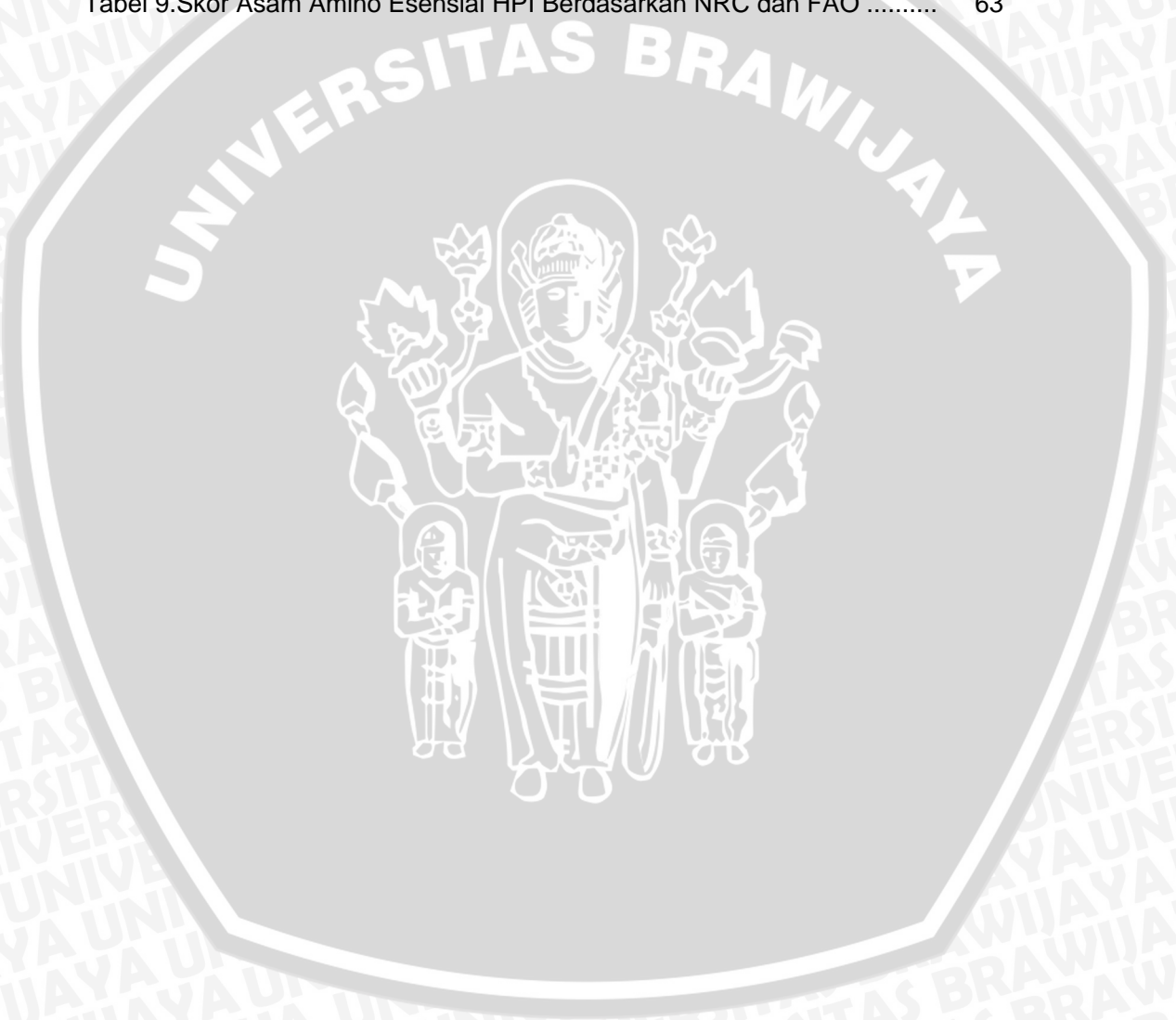
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
RINGKASAN	iii
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR LAMPIRAN	x
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	4
1.3 Tujuan	6
1.4 Hipotesa	6
1.5 Kegunaan	6
1.6Tempat dan Waktu	7
2. TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1 Khamir Laut	8
2.2 Protease	10
2.2.1 Protease Asam Khamir Laut	11
2.3 Isolasi Enzim	13
2.4 Pemurnian Enzim	15
2.4.1 Membran Dialisis	17
2.4.2 Buffer	18
2.5 Hidrolisat Protein Ikan	19
2.5.1 Hidrolisis	20
2.5.2 Macam-Macam Hidrolisis	21
3. MATERI DAN METODE PENELITIAN	23
3.1 Bahan dan Alat	23
3.2 Metode Penelitian	23
3.3 Prosedur Penelitian	24
3.3.1Kultur Khamir Laut	24
3.3.2 Isolasi Enzim	25
3.3.2.1 Ekstraksi Khamir Laut	25
3.3.3Pemurnian Enzim	26
3.3.3.1 Pengendapan dengan Amonium Sulfat	26
3.3.3.2 Dialisis	28
3.3.4 Karakteristik Enzim	31
3.3.4.1 Uji Konsentrasi Protein	31
3.3.4.2 Penentuan Aktivitas Protease	34
3.3.4.3 Penentuan K_M dan V_{maks}	37
3.4 Kapasitas Hidrolisis Ikan Peperek	40

3.4.1	Derajat Hidrolisis	40
3.4.2	SDS-PAGE	43
3.4.3	Analisa Profil Asam Amino dengan HPLC.....	46
4.	HASIL DAN PEMBAHASAN	49
4.1	Sel Khamir Laut.....	49
4.2	Karakteristik Protease Khamir Laut.....	49
4.2.1	Konsentrasi Protein Protease.....	50
4.2.2	Aktivitas Protease Dialisat Khamir Laut	50
4.2.3	V_{maks} dan K_M Protease Khamir Laut.....	51
4.3	Kapasitas Dialisat Khamir Laut dalam Hidrolisis Ikan Peperek.....	53
4.3.1	Derajat Hidrolisis	53
4.3.1.1	Perlakuan Waktu	53
4.3.1.2	Perlakuan pH.....	54
4.3.1.3	Perlakuan Suhu.....	55
4.3.2	Berat Molekul (SDS-PAGE)	57
4.3.3	Profil Asam Amino dengan HPLC	59
5.	PENUTUP	65
5.1	Kesimpulan.....	65
5.2	Saran.....	65
DAFTAR PUSTAKA		66
LAMPIRAN		73



DAFTAR TABEL

Tabel 1.Campuran Kompenen Buffer serta Range pH	18
Tabel 2.Pengenceran Larutan Stok BSA	33
Tabel 3.Prosedur Pengukuran Aktivitas Protease.....	36
Tabel 4.Konsentrasi Pengenceran Substrat Ikan Peperek	38
Tabel 5.Kebalikan Konsentrasi Substrat dan Kebalikan Kecepatan Reaksi ..	40
Tabel 6.Perbandingan Karakteristik Ekstrak Kasar Khamir Laut dengan Dialisat Khamir Laut	50
Tabel 7.Berat Molekul (kDa) Pita Peptida Ikan Peperek dan Hidrolisat Ikan Peperek yang Dihidrolisis dengan Dialisat Khamir Laut	58
Tabel 8.Kandungan Asam Amino Ikan Peperek dan HPI	62
Tabel 9.Skor Asam Amino Esensial HPI Berdasarkan NRC dan FAO	63



DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.Mekanisme Asam Protease dalam Menghidrolisis Ikatan Peptida 13

Gambar 2.Sel Khamir Laut..... 49

Gambar 3.Kurva Lineweaver – Burk Dialisat Khamir Laut 52

Gambar 4.Pengaruh Waktu Hidrolisis terhadap Derajat Hidrolisis..... 53

Gambar 5.Pengaruh pH Hidrolisis terhadap Derajat Hidrolisis 55

Gambar 6.Pengaruh Suhu Hidrolisis terhadap Derajat Hidrolisis 56

Gambar 7.(1) Marker Prestained Protein Ladder 57

 (2) Ikan Peperek..... 57

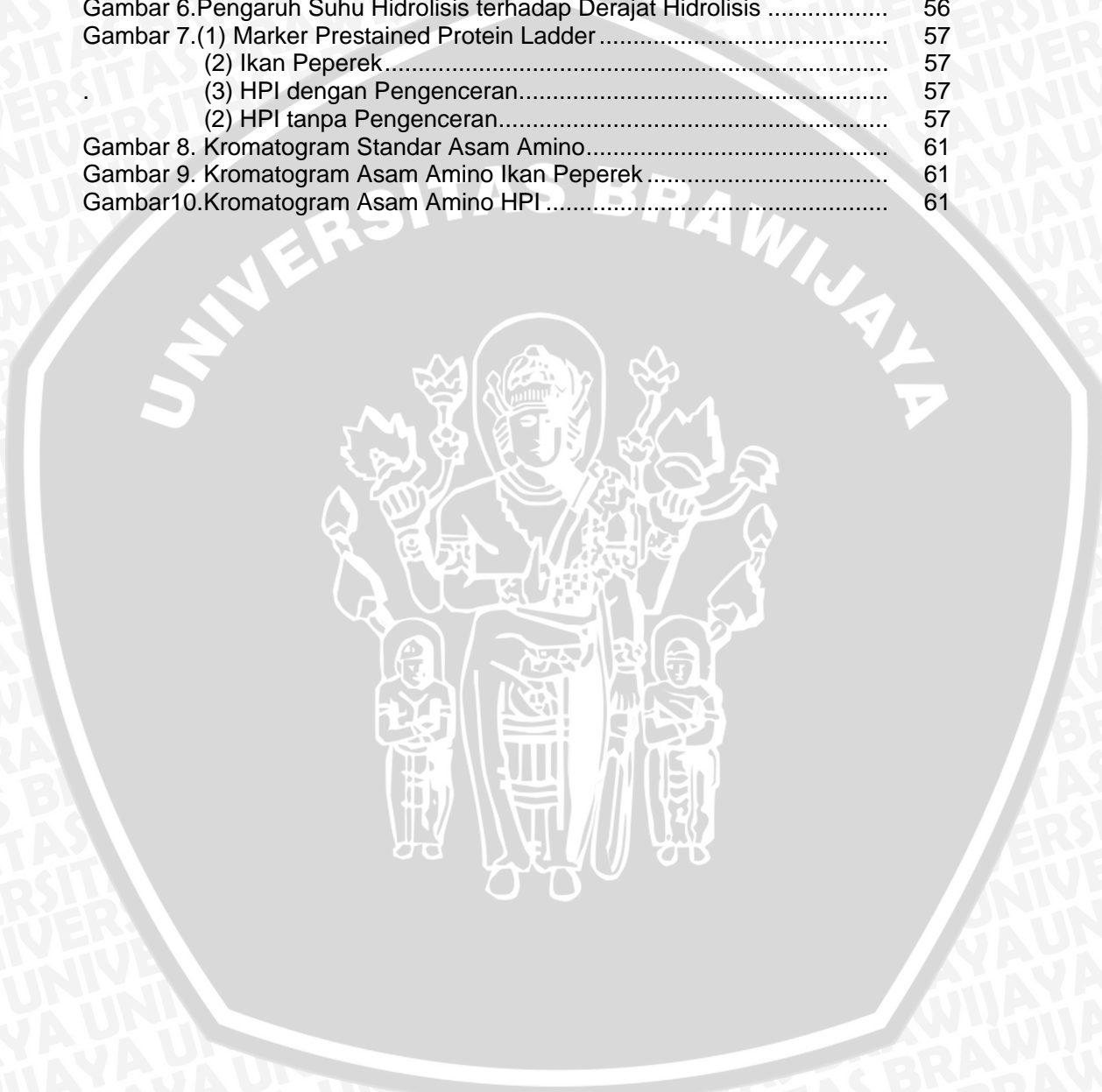
 (3) HPI dengan Pengenceran..... 57

 (2) HPI tanpa Pengenceran..... 57

Gambar 8. Kromatogram Standar Asam Amino..... 61

Gambar 9. Kromatogram Asam Amino Ikan Peperek 61

Gambar10.Kromatogram Asam Amino HPI 61



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.Perhitungan Konsentrasi Protein.....	73
Lampiran 2.Perhitungan Aktivitas Protease	75
Lampiran 3.Perhitungan V_{maks} dan K_M	76
Lampiran 4.Perhitungan Derajat Hidrolisis.....	81
Lampiran 5.Perhitungan Berat Molekul (SDS-PAGE)	87
Lampiran 6.Perhitungan Asam Amino dengan HPLC	91



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Khamir laut merupakan khamir yang diisolasi dari lingkungan laut dan dapat tumbuh dengan baik pada medium yang disiapkan dengan air laut dibandingkan pada medium yang disiapkan dengan air tawar. Chi *et al.*, (2009) telah menemukan jenis berbeda dari khamir laut, yang dapat menghasilkan macam-macam enzim *extracellular*, meliputi *amylase*, *protease alkalin*, *asam protease*, *phytase*, *lipase*, *inulinase* dan toksin pembunuh.

Protease atau enzim proteolitik adalah enzim yang memiliki daya katalitik yang spesifik dan efisien terhadap ikatan peptida dari suatu molekul polipeptida atau protein. Protease merupakan jenis enzim esensial yang ada pada khamir, prokariot, tanaman dan hewan (Gupta *et al.*, 2002). Berat molekul protease alkalin murni dari khamir laut *A. pullulans* strain 10 32 kDa (Ma *et al.*, 2007). Protease dapat diisolasi dari tumbuhan (papain dan bromelin), hewan (tripsin, kimotripsin, pepsin, dan renin), mikroorganisme seperti bakteri, kapang, virus, dan cacing parasitik seperti cestoda dan nematoda (Rao *et al.*, 1998).

Enzim pada umumnya dihasilkan didalam sel, beberapa diekstraksi melalui dinding sel dan dapat berfungsi diluar sel. Ada 2 tipe enzim yang dikenal yaitu enzim ekstraseluler (berfungsi diluar sel) dan enzim intraseluler (berfungsi didalam sel). Fungsi utama enzim ekstraseluler adalah mengubah nutrient disekitarnya sehingga nutrient tersebut bermanfaat dan dapat masuk kedalam sel. Sedangkan enzim intraseluler mensintesis bahan seluler atau menguraikan nutrient untuk menyediakan energi yang dibutuhkan sel (Aulanni'am, 2005).

Untuk memisahkan protein enzim tertentu dari ekstrak kasar yang mengandung banyak unsur lain maka dilakukan isolasi atau pemurnian enzim (Aulanni'am, 2005). Metode isolasi enzim yang sering digunakan adalah

ekstraksi, koagulasi, sentrifugasi, filtrasi, dan kromatografi (Susi, 2002). Pemisahan dilakukan sentrifugasi pada kecepatan dan gaya berat tertentu sehingga sel-sel mikroorganisme mengendap dan supernatan merupakan cairan yang berisi enzim (Rahayu, 1990).

Teknik pemisahan enzim dari sel dan komponen lain dipengaruhi oleh keberadaan enzim tersebut. Ekstraksi dan isolasi enzim ekstraseluler lebih mudah, karena telah berada diluar sel, sehingga tidak perlu memecah dinding sel. Sedangkan enzim intraseluler merupakan enzim yang melekat pada membran, dilindungi oleh dinding sel yang kuat, maka proses pemisahan enzim harus memperhatikan metode – metode pemecahan sel untuk mengeluarkan enzim (Suhartono, 1989). Untuk mengekstrak enzim intraseluler diperlukan pengrusakan dan penghancuran dinding sel secara kimiawi yaitu dengan menambahkan gula, gliserol, asam atau basa maupun bahan organik lain. Bahan ini dipilih yang sesuai untuk menghasilkan pH dimana stabilitas enzim tetap maksimal (Othmer, 1987).

Pemurnian enzim dapat dilakukan berdasarkan sifat-sifat enzim sebagai protein yang berbeda dalam hal kelarutan, muatan serta ukuran atau berat molekulnya (Lehninger, 1995). Metode-metode pemurnian enzim antara lain pengendapan, filtrasi membran, kromatografi adsorpsi, kromatografi afinitas dan filtrasi gel (Smith, 1993). Metode yang paling sering digunakan adalah pengendapan dengan konsentrasi garam bervariasi (Aulanni'am, 2005). Pemurnian dengan metode pengendapan dilakukan dengan penambahan ammonium sulfat. Penambahan ammonium sulfat kedalam larutan protein akan memberikan pengaruh terhadap kelarutan enzim yaitu menurunkan kelarutan enzim didalam air (*salting out*) (Voet and Voet, 1990).

Dialisis adalah teknik yang digunakan untuk memisahkan senyawa dengan BM-rendah dan senyawa BM-tinggi (*desalting*) melalui membran

semipermeabel. Pada proses ini terjadi perpindahan garam ammonium sulfat yang mempunyai berat molekul yang lebih kecil dari sampel menuju buffer. Perbedaan kecepatan difusi melalui membran terjadi karena adanya perbedaan ukuran molekul sehingga garam akan terpisah dari protein. Membran dialisis untuk protein mempunyai ukuran bervariasi dan yang biasa digunakan adalah ukuran 10-100 μm (Janson dan Ryden, 1998).

Selofan dengan molecular weight cutoff (MWCO) 25 kDa dapat digunakan untuk memindahkan ion nitrogen, asam amino, atau peptida (Schmidt *et al.*, 2007). Sehingga 25 kDa MWCO dapat digunakan dalam proses dialisis protease khamir laut.

Pemurnian dan karakterisasi protease gumpalan susu dari *Mucor pusillus* dilakukan dengan didialisis menggunakan buffer fosfat (0,02 M; pH 6,0) dalam suhu 4°C (Belall *et al.*, 2011). Semua reaksi enzimatik dipengaruhi oleh pH medium tempat reaksi terjadi, oleh karena itu pada setiap percobaan menggunakan enzim diperlukan buffer untuk mengontrol pH reaksi (Martin *et al.*, 1987). Buffer fosfat umumnya banyak digunakan, terdiri dari campuran *monobasic dihydrogen phosphate* dan *dibasic monohydrogen phosphate*. Dengan jumlah garam yang bervariasi, range dari buffer dapat digunakan dengan baik diantara pH 5,8- 8,0. Fosfat mempunyai kapasitas penyanggaan yang sangat tinggi dan mempunyai kelarutan yang sangat tinggi dalam air (DeAngelis, 2007).

Proses pembuatan hidrolisat protein ikan yang paling efisien adalah secara enzimatik. Proses hidrolisis secara enzimatik dipandang lebih efisien dan banyak digunakan dalam industri. Selain itu, proses pengolahannya lebih cepat dan menghasilkan hidrolisat protein tanpa kehilangan banyak asam amino esensial. Pemilihan enzim proteolitik untuk proses hidrolisis protein berdasarkan

pada spesifikasi, pH optimal, kestabilan panas, pengaruh aktivator dan inhibitor, harga, dan ketersediaan enzim bersangkutan (Johnson & Peterson 1974).

Protease asam juga memainkan satu peran penting dalam industri fermentasi karena hidrolisis protein pada fermentasi dapat membebaskan asam amino atau peptida pada kondisi asam. Hal ini dapat menjelaskan bahwa protease asam dapat memainkan satu peran penting dalam degradasi bahan protein pada lingkungan asam (Shahidi and Kamil, 2001).

Menurut Penelitian Ahmad (2010), ekstrak kasar khamir laut mengandung enzim alkalin protease dengan nilai aktivitas 21,5 mU/mL/menit. Aktivitas enzim ekstrak kasar khamir laut tersebut terbilang masih rendah dibandingkan dengan hasil penelitian Chi *et al.*, (2008), ekstrak murni khamir laut *Aureobasidium pullulans* strain 10 yang diisolasi dari laut china mempunyai nilai aktivitas protease 623,1 U/mg ; 7,2 U/mg. Rendahnya nilai aktivitas dimungkinkan karena ekstrak yang diperoleh dari khamir laut masih belum dimurnikan (ekstrak kasar) sehingga perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan tahapan yang lebih murni.

1.2 Perumusan Masalah

Khamir laut merupakan mikroorganisme uniseluler dari golongan jamur, bersifat kemoorganotrop. Khamir laut yang diisolasi dari pantai Jawa Timur oleh Sukoso (2002) dan Wiyanto (2003) memiliki potensi bioteknologi dibidang pangan. Khamir laut dapat memproduksi protease alkalin, seperti *Candida lipolytica*, *Yarrowia lipolytica* dan *Aureobasidium pullulans* (Tobe *et al.*, 1976; Ogrzydziak, 1993; Donaghy and McKay, 1993). Chi *et al.*, (2007) menambahkan bahwa khamir laut dengan strain *Aureobasidium pullulans* yang diisolasi dari sedimen pantai di Qingdao, China, memiliki aktivitas protease 623.1 U/mg.

Protease merupakan enzim proteolitik. Protease dibagi kedalam enam kelompok: serin protease, treonin protease, cistein protease, asam protease dan

metellaprotease. Protease dapat digunakan dalam berbagai aplikasibioteknologi yang berbeda (Chi *et al.*, 2009).

Pemurnian enzim dilakukan dengan tujuan untuk memisahkan enzim dari pengotor komponen lain. Hal ini diperlukan untuk menghilangkan senyawa lain yang mengganggu sisi aktif enzim (Othmer, 1987). Menurut Smith (1993), proses pemurnian enzim dapat dilakukan dengan metode pengendapan, filtrasi membran, kromatografi serapan, afinitas dan filtrasi gel.

Aktivitas spesifik akan meningkat selama proses pemurnian dan akan mencapai nilai maksimal dan konstan jika enzim tersebut dalam keadaan murni (Lehninger, 1995). Susi (2002), menambahkan aktivitas spesifik yang semakin tinggi menunjukkan enzim semakin murni. Hal ini disebabkan kehilangan protein non enzim pada beberapa tahap pemisahan yang dilalui dalam pemurnian enzim.

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. Dasar proses hidrolisis enzimatik adalah pemutusan ikatan peptida oleh enzim dengan bantuan air. Hidrolisis ikatan peptida dapat meningkatkan jumlah gugus terionisasi dan sisi hidrofilik karena membukanya molekul protein, umumnya meningkatkan kelarutan dan menurunkan viskositas dan diamati dengan meningkatnya derajat hidrolisis (Zayas 1997). Giese (1994) menyebutkan protease mengkatalisis pemutusan ikatan peptida yang akan menghasilkan unit peptida dan molekul lebih kecil yang akan mudah larut.

Oleh karena itu perlu dilakukan pengkajian lebih lanjut pada karakteristik protease ekstraseluler dari dialisat khamir laut yaitu aktivitas protease dialisat khamir laut, konsentrasi protease dialisat khamir laut, konstanta Michaelis-

Menten (K_M) dan kecepatan maksimal (V_{maks}), serta kemampuan dialisat khamir laut dalam menghidrolisis ikan peperek meliputi DH (derajat hidrolisis), berat molekul (SDS-PAGE) dan profil asam amino (HPLC).

1.3 Tujuan

- Mengetahui karakteristik dialisat ekstraseluler khamir laut meliputi aktivitas protease dialisat khamir laut, konsentrasi protease dialisat khamir laut, konstanta Michaelis-Menten (K_M) dan kecepatan maksimal (V_{maks}).
- Mengetahui kemampuan dialisat ekstraseluler khamir laut dalam menghidrolisis ikan peperek meliputi DH (derajat hidrolisis), berat molekul (SDS-PAGE) dan profil asam amino (HPLC).

1.4 Hipotesa

Hipotesa yang dapat diambil adalah :

- Diduga dialisat ekstraseluler khamir laut yang didialisis dengan selofan MWCO 25 kDa pada pH 6,0 mempunyai karakteristik proteasea.
- Diduga dialisat ekstraseluler khamir laut yang didialisis dengan selofan MWCO 25 kDa pada pH 6,0 mampu menghidrolisis ikan peperek.

1.5 Kegunaan

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai karakteristik protease ekstraseluler pada dialisat khamir laut serta pemanfaatan dialisat khamir laut sebagai bahan penghidrolisis dalam proses pembuatan hidrolisat protein ikan peperek.

1.6 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Biologi medical (Biomedik) Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, dan Laboratorium Kimia Organik Fakultas MIPA, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Pada bulan November 2010.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Khamir Laut

Khamir adalah organisme uniseluler dari golongan jamur. Khamir mempunyai sifat kemoautotrof, bereproduksi seksual dengan spora dan aseksual dengan pertunasan atau pembelahan atau kombinasi keduanya (Kreger-Van Rij, 1984). Reed (1991), menjelaskan dalam sistematik khamir termasuk dalam Kingdom Fungi Divisi *Eumecotina* yang terbagi dalam 4 subdivisi : *Phycomycetes* (*zygomycetes*), *Ascomycetes*, *Basidiomycetes*, dan *Deuteromycetes*. Sebagian besar khamir dialam adalah subdivisi *Ascomycetes* dan *Deuteromycetes* (tidak berspora), dan sebagian kecil lainnya termasuk dalam subdivisi *Basidiomycetes*, *Phycomycetes* adalah fungi berfilamen, karena tidak ada khamir yang masuk termasuk dalam subdivisi ini.

Khamir termasuk fungi, tetapi dibedakan dari kapang karena bentuknya yang uniseluler. Reproduksi vegetatif pada khamir terutama pada pertunasan. Sebagai sel tunggal, khamir tumbuh dan berkembang biak lebih cepat dibandingkan dengan kapang yang tumbuh dengan pembentukan filamen. Khamir juga berbeda dari ganggang karena tidak dapat melakukan fotosintesis dan berbeda juga dari protozoa karena mempunyai dinding sel yang kuat. Khamir mudah dibedakan dari bakteri karena ukurannya lebih besar dan morfologi yang berbeda (Fardiaz, 1992).

Khamir laut merupakan khamir yang mampu hidup dilingkungan bersalinitas tinggi (air laut). Karakteristik khamir laut tidak jauh berbeda dengan khamir pada umumnya (kecuali habitat). Khamir laut terdapat di lingkungan perairan, dimana dapat ditemukan disaluran pencernaan organisme laut, air laut dan pasir laut (Vogel *et al.*, 2007; Kutty and Phillip, 2008). Kutty and Phillip (2008), melaporkan bahwa khamir laut yang terdapat dilaut yaitu *Candida*,

Cryptococcus, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Hansenula*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Trichosporon*, and *Torulopsis*.

Wiyanto (2003), melaporkan bahwa khamir laut yang diisolasi dari pantai perairan laut jawa memiliki ukuran panjang 9 – 28 μm dan lebar 1,5 - 3 μm , memiliki hifa bersekat berwarna krem transparan, pertumbuhan vegetatifnya berupa pertunasan multilateral. sifat fisiologis khamir laut tersebut antara lain : mampu tumbuh pada tekanan osmosa tinggi (10% NaCl + 5% glukosa); mengasimilasi dengan baik senyawa karbon jenis glukosa, galaktosa, fruktosa, dan gula serta mengasimilasi dengan lemah terhadap maltosa dan sukrosa; fermentasi karbohidrat (glukosa, galaktosa, fruktosa, gula, maltosa dan sukrosa) terjadi tidak pada dasar tabung reaksi; konsentrasi gula terbaik untuk produksi biomassa yang lebih baik dari *ammonium sulfat* dan *ammonium asetat* pada konsentrasi 0,1 g/10 mL (1%); tidak mampu tumbuh pada 37 °C, termasuk jenis khamir psikorotrofik; ukuran DNA totalnya sekitar 60 kb; memiliki kesamaan karakteristik dengan *Candida aquatic* (83,3%) dan *Candida sake* (81,8%).

Khamir laut merupakan khamir yang diisolasi dari lingkungan laut dan dapat tumbuh dengan baik pada medium yang disiapkan dengan air laut dibandingkan pada medium yang disiapkan dengan air tawar. Pada pembahasan terbaru, ini telah ditemukan jenis berbeda dari khamir laut, yang dapat menghasilkan macam-macam enzim *extracellular*, meliputi *amylase*, *protease alkalin*, *asam protease*, *phytase*, *lipase*, *inulinase* dan toksin pembunuh (Chi *et al.*, 2009).

Khamir laut dapat memproduksi protease alkalin, seperti *Candida lipolytica*, *Yarrowia lipolytica* dan *Aureobasidium pullulans* (Tobe *et al.*, 1976; Ogrzydziak, 1993; Donaghy and McKay, 1993). Khususnya, enzim ekstraseluler dari *Yarrowia lipolytica*, protease dapat mencapai beberapa gram perliter dibawah kondisi optimum (Barth and Garlardin, 1996). Menurut Chi *et al.*, (2007),

bahwa khamir laut dengan strain *Aureobasidium pullulans* yang diisolasi dari sedimen pantai di Qingdao, China, memiliki aktivitas protease 623.1 U/mg.

2.2 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).

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 (Yatsumi dan Takenaka, 2000), yaitu :

a) Protease Serin

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

2.2.1 Protease Asam Khamir Laut

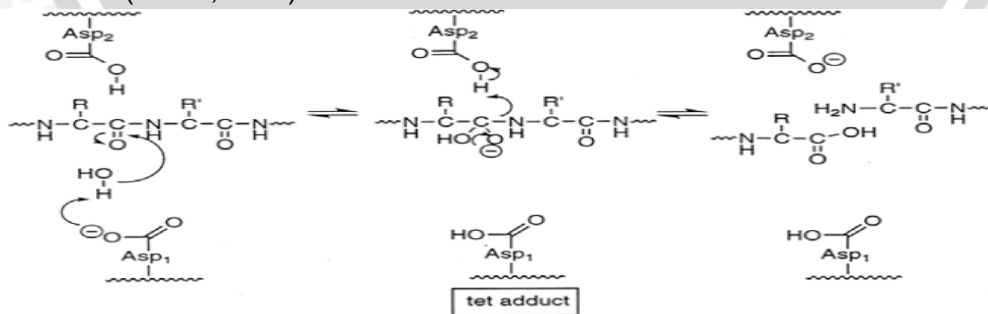
Protease asam adalah *endopeptidases* dan aktif pada kondisi asam. Oleh sebab itu, *aspartyl proteases* juga dikenal sebagai *acid protease*. Hingga sekitar tahun 1980, enzim ini dikenal sebagai *carboxyl proteinase*. Sejak ditemukan dua group fungsional dengan lokasi katalitis dari enzim ini selalu dalam golongan *aspartic acid carboxyl*, nama baru *aspartyl protease* telah diadopsi. Sehingga '*aspartyl protease*' jadilah lebih sesuaikan dibandingkan '*acid protease*' karena beberapa enzim seperti *rennin*, sekarang lebih dikenal dengan *aspartyl protease*,

bukan termasuk golongan *acid protease* karena mempunyai aktivitas pH optimum sekitar 6 -8 (Shahidi and Kamil, 2001).

Protease Asam juga memainkan satu peran penting dalam industri fermentasi karena hidrolisis protein pada fermentasi dapat membebaskan asam amino atau peptida pada kondisi asam (Kitano *et al.*, 2002). Hal ini dapat menjelaskan bahwa *acid protease* dapat memainkan satu peran penting dalam pendegradasi bahan protein pada lingkungan asam. Contohnya, dapat digunakan untuk menghilangkan protein pada kulit udang untuk memperoleh chitin dan chitosan (Shahidi and Kamil, 2001).

Protease asam merupakan protease endopeptidase yang bekerja pada ikatan peptide dibagian internal rantai polipeptida (dari N terminal dan C terminal). Aktivitas katalitiknya bergantung pada residu asam aspartat. Sisi aktif residu asam aspartat terletak pada Aspartat-Threonin-Glisin-Xaa (Serin atau Threonin). Residu ini terletak diantara gugus amino dan gugus karboksil yang dihubungkan oleh ikatan glikogen (Rao *et al.*, 1998).

Spesifikasi dan mekanisme hidrolisis asam protease adalah dua residu aspartat pada sisi aktif enzim, cenderung berlawanan pada ikatan peptida yang akan dibelah. Satu asp (Asp-COO-) bertindak sebagai basa untuk mengaktifkan penyerangan H-OH, asp yang kedua (Asp-COOH) bertindak sebagai asam umum untuk memproton produk amina. Kedua asps bertindak melengkapi model perusakan (Walsh, 2011).



Gambar 1. Mekanisme asam protease dalam menghidrolisis ikatan peptida

2.3. Isolasi enzim

Enzim adalah suatu protein yang harus dipisahkan dengan komponen lain. Berdasarkan lokasi enzim didalam sel, maka dikenal dengan istilah enzim ekstraseluler (diluar sel) dan intraseluler (didalam sel). Prosedur isolasi untuk enzim ekstraseluler berbeda dengan enzim intraseluler. Isolasi enzim ekstraseluler lebih mudah dibanding enzim intraseluler, karena tanpa pemecahan sel dan enzim yang diperoleh relatif lebih mudah terpisah dari pengotornya (Martoharso, 1987).

Untuk melakukan proses penghancuran dinding sel dan membran pada proses ekstraksi enzim, metode yang digunakan tergantung pada tipe sel itu sendiri. Sel tanaman umumnya lebih sulit dihancurkan dari sel hewan, karena adanya polisakarida di sekitarnya. Walaupun demikian tidak ada patokan yang tetap tentang jenis teknik penghancuran tersebut, mengingat enzim dapat saja tidak aktif selama proses berlangsung (Martoharsono, 1987).

Menurut Martoharsono (1987), ada beberapa metode penghancuran sel yaitu :

a. Cara Fisika

1. Dengan menggunakan alat pemancar gelombang ultrasonik yang disebut ultrasenikator. Hal ini ditandai dengan berubahnya cairan keruh dari sel menjadi endapan dan cairan jernih.
2. Dengan penggerusan, penggilingan memakai pasir kwarsa bersih dan steril
3. Dengan bender
4. Dengan homogenisator
5. Pembekuan, hal ini dikarenakan adanya sifat anomaly air.

b. Cara Kimia

Cara kimia ini adalah suatu cara yang didasarkan pada sifat dari dinding sel. Cara kimia ini dapat dilakukan melalui tekanan osmotik, penambahan basa penggunaan detergen, dengan solvent organik, osmotik shock dan lisis secara enzimatik.

Setelah melalui penghancuran maka untuk mendapatkan ekstrak kasar dari enzim harus dilakukan proses sentrifugasi guna memisahkan enzim dari senyawa yang tidak larut. Agar pada proses sentrifugasi enzim berada pada lapisan air (supernatan) maka sebelum dilakukan proses sentrifugasi ekstrak kasar enzim dihomogenisasi dengan larutan penyangga (larutan buffer) (Cooper, 1977).

Menurut Judoamidjojo *et al.*, (1992), pemisahan partikel dari larutan pada metode sentrifugasi termasuk pemisahan sel-sel dari medium biakan atau penyingkiran hancuran sel serta pengumpulan endapan. Rahayu (1990), menjelaskan bahwa sentrifugasi dilakukan pada kecepatan dan gaya berat tertentu sehingga sel-sel mikroorganisme mengendap dan mengendap dan supernatan merupakan cairan yang berisi enzim. Isolasi enzim dilakukan pada suhu rendah dan campuran ditambah larutan penyangga (buffer) untuk mempertahankan kestabilan enzim. Enzim yang diharapkan nantinya akan berada pada lapisan air (supernatan).

2.4 Pemurnian Enzim

Pemurnian enzim dapat dilakukan berdasarkan sifat-sifat enzim sebagai protein yang berbeda dalam hal kelarutan, muatan, dan ukuran atau berat molekulnya (Lehninger, 1995). Beberapa metode pemurnian enzim adalah pengendapan, filtrasi membran, kromatografi adsorpsi, kromatografi afinitas, dan filtrasi gel (McKee and James, 2003).

Menurut Sorensen *et al.*, (1999), metode pengendapan dengan konsentrasi garam bervariasi dilakukan dengan menambahkan garam ammonium sulfat kedalam ekstrak kasar enzim disertai dengan pengadukan pada suhu rendah. Garam yang ditambahkan dapat berupa ammonium sulfat, natrium sulfat, natrium fosfat dan sebagainya tergantung pada jenis enzim.

Menurut Suhartono (1989), ammonium sulfat lebih disukai karena kelarutannya tinggi, harga relatif murah dan umumnya tidak mempengaruhi struktur protein. Konsentrasi garam ammonium sulfat yang ditambahkan akan mempengaruhi kelarutan protein. Pada konsentrasi rendah, ion-ion garam akan mengelilingi molekul protein dan mencegah bersatunya molekul-molekul ini, sehingga protein melarut. Peristiwa ini disebut *salting in*. pada konsentrasi tinggi, terjadi peningkatan muatan listrik di sekitar protein, yang akan menarik mantel air dari koloid protein. Interaksi hidrofobik diantara sesama molekul protein pada suasana ionik tinggi akan menurunkan kelarutan protein. Peristiwa ini disebut *salting out*. *Salting out* dengan garam ini dapat digunakan untuk memisahkan protein dari komponen terlarut lainnya. Seringkali penggumpalan dengan *salting out* dilakukan pada suhu rendah (4°C). enzim yang telah menggumpal dipisahkan dari supernatan dengan sentrifus. Enzim ini masih belum murni dan tercampur dengan protein lainnya, walaupun sudah bebas dari kontaminan non protein.

Menurut Davidson and Sittman (1999), penambahan ammonium sulfat berpengaruh terhadap protein yang terendapkan selama proses pemurnian. Ion-ion garam ammonium sulfat akan berkompetisi dengan protein untuk menarik molekul air. Ion-ion garam memiliki kelarutan lebih besar dibandingkan dengan protein sehingga ion garam akan menarik molekul air dari protein enzim. Protein-protein enzim akan berinteraksi membentuk gumpalan dan mengendap. Proses ini dilakukan pada suhu rendah (4°C) sehingga protein akan mengendap tanpa terdenaturasi.

Garam yang tersisa pada endapan enzim dipisahkan dengan dialisis (McKee and James, 2003). Dialisis merupakan proses pemisahan molekul yang lebih besar melalui membran semipermeabel. Pada proses ini terjadi perpindahan garam ammonium sulfat yang mempunyai berat molekul lebih kecil dari sampel menuju dalam larutan buffer. Pada waktu garam bergerak melalui pori-pori membran, garam teradsorpsi pada permukaan membran dan selanjutnya bergerak dari sisi membran yang satu ke sisi membran lain. Difusi garam terjadi karena adanya gradient konsentrasi. Perbedaan kecepatan difusi melalui membran terjadi karena adanya perbedaan ukuran molekul sehingga menyebabkan garam terpisah dari protein (Sorensen *et al.*, 1999).

Suatu campuran protein dan molekul terlarut kecil dapat dipisahkan dengan dialisis melalui membran semipermeable. Pemilihan molekul yang ditahan didalam membran atau dikeluarkan bergantung pada ukuran pori membran dialisis (Davidson dan Sittman, 1999). Selama dialisis, molekul yang kecil (BM lebih kecil dari ukuran pori-pori dialisis) akan keluar dari kantong dialisis secara difusi sampai konsentrasi molekul tersebut didalam dan diluar membran selulosa sama (Sorensen *et al.*, 1999).

Membran semipermeabel memiliki ukuran pori cukup besar untuk memungkinkan molekul kecil lewat dengan bebas, tetapi menghambat perpindahan protein dan makromolekul lainnya. Membran tersebut digunakan dalam pemurnian protein. Dialisis sering digunakan untuk memisahkan kontaminan dengan ukuran molekul kecil. Larutan protein dimasukkan dalam kantong tertutup yang terbuat dari membran dan dicelupkan dalam larutan buffer dengan volume jauh lebih besar. Setelah beberapa jam, kontaminan dengan berat molekul rendah keluar dan lingkungan awal molekul protein digantikan oleh larutan buffer dari luar. Larutan buffer diluar diganti beberapa kali (Matthews *et al.*, 2000). Membran dialisis memungkinkan keluarnya molekul garam dan

menahan protein tetap didalam. Selanjutnya, kantong dialisis ditempatkan dalam larutan buffer dengan volume besar dan diaduk selama beberapa jam (16-24 jam), yang memungkinkan terjadinya kesetimbangan konsentrasi antara larutan didalam membran dialisis dan larutan perendamannya (Campbell, 1999).

2.4.1 Membran Dialisis

Membran dapat didefinisikan sebagai pemisahan secara selektif dengan memisahkan beberapa jenis tertentu pada suatu cairan dengan mengkombinasikan penyaringan dan mekanisme serapan secara difusi (Tansel *et al.*, 2000). Membran dapat memisahkan secara selektif komponen dengan range dari ukuran partikel dan berat molekul, dari bahan makromolekul seperti *starch* dan protein kedalam ion monovalen (Baker, 2000). Rongga serabut semipermeabel pada membran dialisis sering dikenal dengan *molecular weight cut off* (MWCO). Range pori membran dari *molecular weight cut off* (MWCO) adalah 5,000 - 100,000 Dalton (Stenken, 2011). Tabung dialisis dengan *molecular weight cutoff* (MWCO) 25 kDa dapat digunakan untuk memindahkan ion nitrogen, asam amino, atau peptida (Schmidt *et al.*, 2007).

2.4.2 Buffer

Semua reaksi enzimatis dipengaruhi oleh pH medium tempat reaksi terjadi, oleh karena itu pada setiap percobaan menggunakan enzim diperlukan buffer untuk mengontrol pH reaksi (Martin *et al.*, 1987). Buffer diperlukan untuk mempertahankan pH dari enzim pada beberapa mikroorganisme. Kebanyakan enzim bekerja pada kondisi tertentu; jika pH keluar dari range, enzim akan menjadi pelan atau tidak akan bekerja, dan dapat terdenaturasi. Dengan demikian akan mengubah aktifitas katalitik mereka. Buffer *carbonic acid* (H₂CO₃) dan *bicarbonate* (HCO₃⁻) ada pada plasma darah, untuk memelihara

pH di antara 7,35 dan 7,45. Dalam industri, buffer digunakan dalam proses peragian dan mengatur kondisi yang sesuai dalam proses pencelupan pada pabrik warna. Mereka dipergunakan untuk menganalisa unsur dan kalibrasi pada pH meter. Campuran komponen buffer serta range pH dapat dilihat pada tabel 1 (Wikipedia, 2010).

Tabel 1. Campuran Komponen Buffer Serta Range pH

Komponen	Range pH
HCl, Sodium citrate	1 – 5
Citric acid, Sodium citrate	2,5 – 5,6
Acetic acid, Sodium acetate	3,7 – 5,6
K_2HPO_4 , KH_2PO_4	5,8 – 8
Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4	6 – 7,5
CHES	8,6–10
Borax, Sodium hydroxide	9,2 – 11

Buffer fosfat umumnya banyak digunakan, terdiri dari campuran *monobasic dihydrogen phosphate* dan *dibasic monohydrogen phosphate*. Dengan jumlah garam yang bervariasi, range dari buffer dapat digunakan dengan baik diantara pH 5,8 - 8,0. Fosfat mempunyai kapasitas penyanggaan yang sangat tinggi dan mempunyai kelarutan yang sangat tinggi dalam air (DeAngelis, 2007).

2.5 Hidrolisat Protein Ikan

Hidrolisat protein ikan (HPI) adalah produk cairan yang dibuat dari ikan dengan penambahan enzim proteolitik untuk mempercepat hidrolisis dalam kondisi terkontrol dengan hasil akhir berupa campuran komponen protein (Pigott dan Tucker, 1990). Hidrolisat protein ikan merupakan produk yang dihasilkan dari peruraian protein ikan menjadi senyawa-senyawa berantai pendek karena adanya proses hidrolisis baik oleh enzim, asam maupun basa (Aryani *et al.*, 2003).

HPI merupakan pengembangan dari proses pembuatan konsentrat protein ikan. Konsentrat protein ikan masih mempunyai sifat fungsional yang rendah. Sementara itu, HPI sifat fungsionalnya lebih tinggi, sehingga lebih luas pemanfaatannya. Hidrolisat protein dari ikan lebih bagus dibandingkan dari sumber hewani lainnya, karena komposisi protein cukup lengkap. Oleh karena itu, dapat meningkatkan mutu produk akhir HPI (Hadiwiyoto, 1993). 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).

Proses pembuatan hidrolisat protein ikan yang paling efisien adalah secara enzimatis. Proses hidrolisis secara enzimatis dipandang lebih efisien dan banyak digunakan dalam industri. Selain itu, proses pengolahannya lebih cepat dan menghasilkan hidrolisat protein tanpa kehilangan banyak asam amino esensial. Pemilihan enzim proteolitik untuk proses hidrolisis protein berdasarkan pada spesifikasi, pH optimal, kestabilan panas, pengaruh aktivator dan inhibitor, harga, dan ketersediaan enzim bersangkutan (Johnson & Peterson 1974).

Hidrolisat protein ikan berdasarkan tingginya tingkat kelarutan dan pencernaan, secara luas digunakan sebagai bahan tambahan makanan dalam sup, kuah daging, rasa daging, makanan diet, penyedap sosis, biscuit, crackers, dan mayonnaise (Pigot dan Tucker, 1990). Petersen (1981) dalam Shativel *et al.*, (2005) melaporkan bahwa tingginya daya larut dari hidrolisat protein ikan salmon merah menggunakan alkalase dan protex menunjukkan aplikasi yang potensial pada campuran makanan dalam perbaikan terhadap penampakan dan rasa yang halus pada produk.

2.5.1 Hidrolisis

Hidrolisat protein merupakan suatu campuran asam amino yang diperoleh melalui degradasi hidrolitik protein dengan asam, basa, atau enzim proteolitik. Hidrolisis secara parsial mampu memecah molekul protein menjadi beberapa gugus asam amino maupun melalui pemutusan ikatan rantai peptida (Rehm & Reed 1995). Hidrolisat umumnya mengandung peptida dengan bobot molekul rendah terdiri atas 2 hingga 4 residu amino. Sementara hidrolisis secara enzimatis dapat memperkecil ukuran peptida, yang dapat merubah karakteristik dan meningkatkan kualitas potein (Petersen, 1981). Kristinsson and Rasco (2000) menambahkan bahwa hidrolisat protein menggunakan enzim proteolitik dapat memecah ikatan peptida.

Pemecahan ikatan peptida dalam kondisi asam atau basa kuat merupakan proses hidrolisis kimia dan pemecahan ikatan peptida menggunakan enzim merupakan proses hidrolisis biokimia (Kristinson and rasco, 2000).

2.5.2 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).

b) Hidrolisis Asam/Basa

Metode hidrolisis asam/basa telah lama dikenal dan diterapkan 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 (Kristinson and Rasco, 2000).

c) Hidrolisis Enzim

Proses hidrolisis protein secara enzimatik 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 enzimatik 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 (Kristinson and Rasco, 2000)

3. MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Bahan Dan Alat Penelitian

Bahan utama dalam penelitian ini adalah khamir laut yang diperoleh dari hasil kultur (Fahrudin, 2002), protease diperoleh dari ekstraksi khamir laut. Ikan peperek didapatkan dari Pelabuhan Tanjung Tembaga, Probolinggo. Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah larutan biuret, aquadest, BSA (*bovine serum albumin*), *Folin-phenol Ciocalteu reagent*, tirosin, 10% TCA (*trichloroacetic acid*), 0,5% larutan kasein, *glicine-NaOH buffer* (0,05M, pH 9,5), H₂SO₄, NaOH, larutan *nestler*, *Separating gel* (12,5%), *stacking gel* (12,5%), *reducing sample buffer* (RSB), *amonium persulfat* (APS), *tetrametiletildiamin* (TEMED) dan *cooamassie blue*, *O-ftatalaldehid* (OPA), ammonium sulfat, selofan, buffer fosphat, *phosphate buffer saline* (PBS), dan etanol.

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah galon, botol bensin, kompor, aerator, selang, corong, sentrifuse (Hettich mikro 22R), *waterbath*, pH kertas, gelas ukur, *stirrer*, beaker glass, pH meter, inkubator, falcon, kuvet, *ependorf*, mikropipet, *blue pippets*, timbangan analitik, spektrofotometer (Shimadzu UV-VIS 1700), baskom, blender, *Sodium Deodecyl Sulphate Polyacrilamid Gel Electroforesis* (SDS-PAGE) dan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC).

3.2 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksploratif. Penelitian eksploratif adalah jenis penelitian yang berusaha mencari ide-ide atau hubungan-hubungan yang baru (Umar, 1999). Metode eksploratif 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).

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Kultur Khamir Laut

- Persiapan Bahan :
 - Media air laut 15000 mL (15 L)
 - Gula pasir 0,5% dan pupuk daun 0,2 % : dilarutkan 75 g gula pasir dan 30 g pupuk daun dalam 100 mL air laut dengan stirer
 - Perhitungan gula pasir 0,5% = $\frac{0,5}{100} \times 15000 = 75 \text{ g}$
 - Perhitungan pupuk daun 0,2 % = $\frac{0,2}{100} \times 15000 = 30 \text{ g}$
 - Stok khamir laut 30 mL diisolasi dari pantai perairan Laut Jawa
- Prosedur :
 - Air laut 15000 mL di sterilisasi pada suhu 121°C yang berfungsi untuk membunuh semua mikroorganisme yang tahan panas
 - Didiamkan semalam
 - Ditambahkan 0,5% gula dan 0,2% pupuk daun kemudian ditambahkan 30 mL stok khamir laut, gula dan pupuk mempunyai fungsi sebagai nutrisi
 - Diaerasi selama 7-10 hari
 - Terdapat endapan (*marine yeast*)

3.3.2 Isolasi Enzim

3.3.2.1 Ekstraksi Khamir Laut

Proses ekstraksi khamir laut dilakukan dengan metode sentrifugasi (Chi *et al.*, 2006 ; Ping *et al.*, 2007). Prinsip dari sentrifugasi adalah pemisahan

molekul berdasarkan densitasnya (Sorensen *et al.*, 1999). Molekul yang densitasnya besar akan mengendap dibagian bawah tabung sentrifuse akibat adanya gaya sentrifugal (Child, 1974). Untuk mendapatkan ekstrak kasar dari enzim harus dilakukan proses sentrifugasi guna memisahkan enzim dari senyawa yang tidak larut. Agar pada proses sentrifugasi enzim berada pada lapisan air (supernatan) maka sebelum dilakukan proses sentrifugasi ekstra kasar enzim dihomogenisasi dengan larutan penyangga (larutan buffer) (Cooper, 1977)

- Persiapan bahan :

- 400 mL khamir laut hasil kultur
- Kasein 0,5% 200 mL : larutkan 1 g kasein dalam 200 mL buffer glisin NaOH 0,05 M pH 9
- Perhitungan kasein 0,5% =

$$\frac{0,5}{100} \times 200 = 1\text{g dalam } 200\text{mL buffer glisin - NaOH}$$

- Buffer glisin NaOH 0,05 M pH 9 : larutkan 0,375 g glisin dalam 100mL aquadest. Larutkan 0,2 g NaOH dalam 100mL aquades, kemudian campurkan larutan glisin dalam NaOH dan atur pH-nya pada pH 9
- Perhitungan Glisin= $M \times V \times \text{BM}$
 $= 0,05 \text{ M} \times 0,1 \text{ L} \times 75,07$
 $= 0,375 \text{ g dilarutkan dalam } 100 \text{ mL aquades}$

- Perhitungan NaOH = $M \times V \times \text{BM}$
 $= 0,05 \text{ M} \times 0,1 \text{ L} \times 40$
 $= 0,2 \text{ g dilarutkan dalam } 100 \text{ mL aquades}$
- 400 mL TCA 10% : larutkan 40 g TCA dalam 400 mL aquades.

- Perhitungan TCA =

$$\frac{10}{100} \times 400 = 40 \text{ g dilarutkan dalam 400 mL aquades}$$

- Prosedur :

- Khamir laut sebanyak 400 mL disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm agar enzim ekstraseluler tidak pecah dan bercampur dengan enzim intraseluler, selama 10 menit dengan suhu 4°C (supernatan)
- 100 mL supernatan ditambahkan 200 mL larutan kasein 0,5% dalam glisin NaOH 0,05 M pada pH 9, kasein berfungsi sebagai sumber substrat yang akan didegradasi oleh protease karena kasein merupakan substrat yang baik untuk mengisolasi bakteri penghasil enzim protease
- Diinkubasi pada suhu 45°C selama 30 menit, kemudian ditambahkan TCA 10% sebanyak 400 mL yang berfungsi untuk menonaktifkan aktivitas protease dalam mendegradasi substrat
- Disentrifus dengan kecepatan 10000 rpm, suhu 4°C selama 10 menit untuk mendapatkan supernatant (700 mL).

3.3.3 Pemurnian Enzim

3.3.3.1 Pengendapan Dengan Amonium Sulfat

Pada penelitian ini digunakan garam ammonium sulfat untuk pemurnian protein, karena ammonium sulfat mudah didapatkan, harganya relatif murah, bersifat menstabilkan enzim serta dapat mencegah aktivitas enzim proteolitik (Yurnaliza, 2002). Pada konsentrasi rendah, garam menaikkan kelarutan protein, suatu gejala yang dikenal dengan sebutan "*salting-in*". garam ion bivalen seperti $MgCl_2$ dan $(NH)_2SO_4$ merupakan garam yang lebih efektif daripada garam ion

monovalen seperti NaCl, NH₄Cl, dan KCl. Pengaruh garam netral terhadap kelarutan protein merupakan fungsi dari kekuatan ioniknya, pada kekuatan ionik yang cukup tinggi, protein akan mengendap dengan sempurna, suatu efek yang disebut "salting-out". Dasar fisiokimia "salting-out" agak kompleks; satu teori menyatakan konsentrasi garam yang tinggi mengambil air hidrasi dipermukaan molekul protein, mengurangi kelarutan protein tersebut.

Penambahan garam kedalam larutan protein mempengaruhi kelarutan protein. Pada konsentrasi tinggi, terjadi peningkatan muatan listrik disekitar protein yang akan menarik mantel air dari koloid protein. Interaksi hidrofobik dimana sesama molekul protein pada suasana ionik tinggi akan menurunkan kelarutan protein. Peristiwa ini disebut "salting out" (salting out dengan garam berguna untuk memisahkan protein dari komponen terlarut lainnya (Aulanni'am, 2005)). Endapan enzim yang terbentuk dipisahkan dengan sentrifugasi (Duetcher, 1990). Garam yang tersisa pada endapan enzim dipisahkan dengan dialisis.

- Preparasi bahan :

- 100 mL supernatan ekstrak khamir laut
- Ammonium sulfat 40% (dianggap sudah optimum dalam mengendapkan protease) : larutkan 40 g ammonium sulfat dalam 100 mL supernatant ekstrak khamir laut
- Perhitungan Ammonium sulfat =
$$\frac{40}{100} \times 100 = 40 \text{ g dilarutkan dalam 100 mL supernatan}$$

- Prosedur :

- 40 g ammonium sulfat 40% dilarutkan dalam 100 mL supernatan ekstrak kasar khamir laut dan diaduk dengan *magnetic stirrer* secara

perlahan, penggunaan garam berguna untuk memisahkan protein dari komponen terlarut lainnya (Aulanni'am, 2005).

- Diamkan selama 30 menit dengan suhu 4°C
- Disentrifugasi dengan kecepatan 10000 rpm , suhu 4°C selama 10 menit untuk mendapatkan pellet

3.3.3.2 Dialisis

Dialisis adalah teknik yang digunakan untuk memisahkan senyawa dengan BM-rendah dan senyawa BM-tinggi (*desalting*) melalui membran semi permeable. Pada proses ini terjadi perpindahan garam ammonium sulfat yang mempunyai berat molekul yang lebih kecil dari sampel menuju dalam larutan buffer. Difusi garam dari satu sisi membran kesisi lain terjadi karena adanya gradient konsentrasi. Perbedaan kecepatan difusi melalui membran terjadi karena adanya perbedaan ukuran molekul sehingga garam akan terpisah dari protein. Membran dialisis untuk protein mempunyai ukuran bervariasi dan yang biasa digunakan adalah ukuran 10-100 µm (Janson dan Ryden, 1998).

- Preparasi bahan :

- Pellet hasil endapan ammonium sulfat
- Pembuatan larutan buffer fosfat dengan mencampurkan larutan
 - a. 0,2 M Na₂HPO₄ (27,8g /1 L)
 - b. 0,2 M Na₂HPO₄. 12H₂O (71,7g /1 L)

Dengan perbandingan

39,0 mL Na₂HPO₄ + 61,0 Na₂HPO₄. 12H₂O dalam 200 mL aquades

- Buffer phosphate 0,1 M pH 6 : siapkan larutan Na₂HPO₄ dengan cara larutkan 0,028392g Na₂HPO₄ dalam 2 mL aquades. Siapkan juga larutan Na₂HPO₄.12H₂O dengan melarutkan 0,143256 g

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ dalam 4 mL aquades. Kemudian campurkan 1,95 mL larutan Na_2HPO_4 dan 3,05 mL larutan $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ serta atur pH-nya hingga pH 6 lalu tambahkan aquades hingga 10 mL.

$$\begin{aligned} \text{a. Perhitungan } \text{Na}_2\text{HPO}_4 &= M \times V \times \text{BM} \\ &= 0,1 \times 0,002 \text{ L} \times 141,96 \\ &= 0,028392 \text{ g dilarutkan dalam } 2 \text{ mL} \\ &\text{aquades} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{b. Perhitungan } \text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O} &= M \times V \times \text{BM} \\ &= 0,1 \times 0,004 \text{ L} \times 358,14 \\ &= 0,143256 \text{ g dilarutkan dalam } 4 \text{ mL} \\ &\text{aquades} \end{aligned}$$

Didapatkan perbandingan :

1,95 mL Na_2HPO_4 + 3,05 mL $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ dalam 10 mL aquades.

- Buffer phosphate 0,05 M pH 6 : siapkan larutan Na_2HPO_4 dengan cara larutkan 1,41 g Na_2HPO_4 dalam 200 mL aquades. Siapkan juga larutan $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ dengan melarutkan 6,267 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ dalam 350 mL aquades. Kemudian campurkan 195 mL larutan Na_2HPO_4 dan 305 mL larutan $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ serta atur pH-nya hingga pH 6 lalu tambahkan aquades hingga 1 L.

$$\begin{aligned} \text{a. Perhitungan } \text{Na}_2\text{HPO}_4 &= M \times V \times \text{BM} \\ &= 0,05 \times 0,02 \text{ L} \times 141,96 \\ &= 1,41 \text{ g dilarutkan dalam } 200 \text{ mL aquades} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{b. Perhitungan } \text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O} &= M \times V \times \text{BM} \\ &= 0,05 \times 0,35 \text{ L} \times 358,14 \\ &= 6,267 \text{ g dilarutkan dalam } 350 \text{ mL} \\ &\text{aquades} \end{aligned}$$

Didapatkan perbandingan :

195 mL Na_2HPO_4 + 305 mL $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ dalam 1L aquades

- Kantung dialisis (selofan) : selofan dididihkan secara bertahap melalui tiga tahapan yaitu : (a) 5% Na_2CO_3 : larutkan 5 g Na_2CO_3 dalam 100 mL aquades, (b) 50 mM EDTA pH 8 : larutkan 1,861 g EDTA dalam 100 mL aquades, (c) aquades steril. Dalam tiap tahapan Selofan direndam hingga tercelup semua, jangan menempel pada dinding – dinding kemudian dicuci dengan aquades dan setiap tahapan perendaman berlangsung selama 15 menit.

- Prosedur :

- Pellet hasil pengendapan ammonium sulfat ditambah 10 mL buffer fosphat 0,1 M pH 6
- Dimasukkan dalam kantong selofan berukuran 25 KDa, setelah dirapatkan tiap ujung dengan penjepit selofan dilakukan dialisa dalam 1 L buffer fosphat 0,05 M pH 6 dan didiamkan selama semalam. Buffer fosphat digunakan untuk mengkondisikan pH (menjaga nilai pH)
- Disiapkan *ependorf* Sebelum pemakaian, *ependorf* ditimbang terlebih dahulu
- Dimasukkan hasil dialisa dalam *ependorf* (0,5 mL)
- Ditambahkan etanol dingin dengan perbandingan (1:1) yang berfungsi untuk menyerap air dan mengendapkan enzim, kemudian diinersi
- Diamkan selama 1 jam dalam refrigerator (4°C)
- Disentrifus dengan kecepatan 12000 rpm , suhu 4°C selama 10 menit untuk mendapatkan pellet

- Dikering-anginkan pellet dalam refrigerator
- Ditimbang *ependorf* untuk mengetahui selisih bobot

3.3.4 Karakteristik Enzim

3.3.4.1 Uji Konsentrasi Protein

Kadar dari suatu protein dapat ditentukan dengan metode biuret. Kenampakan pada tes biuret disebabkan oleh ikatan koordinasi dari ion kupri (II) dari CuSO_4 dengan pasangan elektron bebas dari empat atom nitrogen yang berasal dari asam amino membentuk kompleks koordinasi berwarna (West, 1996). Prinsip dari metode biuret adalah pembentukan kompleks berwarna ungu oleh protein yang memiliki 2 atau lebih ikatan peptida dan garam tembaga (Cu) dalam pereaksi pada kondisi alkali (Caprette, 1995).

Untuk membuat kurva standar maka perlu disiapkan labih dahulu larutan albumin standar dengan berbagai konsentrasi dari rendah sampai tinggi. Masing – masing larutan standar ini diuji dengan biuret dan diamati absorbansinya. Selanjutnya dibuat kurva standar yang menggambarkan hubungan antara konsentrasi protein yang tak diketahui konsentrasinya dapat ditentukan dengan uji biuret ini setelah dihitung berdasarkan kurva standar tersebut (Treggono dan Setaji, 2008).

- Preparasi bahan :
 - Dialisat khamir laut 1000 μL (1 mL): dialisat khamir laut sebanyak 2 mg dilarutkan dalam 1000 μL *phosphate buffer saline* (PBS)
 - Preparasi PBS 1 L: larutkan 2,4 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,2 g NaH_2PO_4 , 0,7 g KH_2PO_4 , 6,8 g KCl dalam 300 mL kemudian distirer dan atur pH hingga pH netral kemudian ditambah aquadest 700mL.

- Reagen biuret 50 mL : larutkan 0,075 g tembaga (II) sulfat (CuSO_4) sebagai sumber ion Cu^{2+} , KI 0,05 g dan Kalium Natrium Tartat ($\text{KN}_4\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$) 0,03 g, Kalium Natrium Tartat sebagai penstabil ion Cu^{2+} lalu tambahkan 15 ml NaOH 2,5 M untuk meningkatkan pH larutan
- Protein standart 2 mL : larutkan protein *standart Bovine Serum Albumin* (BSA) dengan aquades pada konsentrasi 1200 ppm (1200 mg/L) sebagai larutan stok. *Bovine Serum Albumin* (BSA) digunakan sebagai standart karena memiliki intensitas warna relatif paling tinggi bila direaksikan dengan pereaksi biuret (Owusu-Apenten, 2002). Selain itu, BSA memiliki kelarutan tinggi dalam air (Sorensen et al., 1999).

- Pembuatan Larutan Standar :

a. Larutan Standar 15.625

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

$$V_1 \cdot 1200 = 1. 15,625$$

$$V_1 = 13$$

b. Larutan Standar 31.25

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

$$V_1 \cdot 1200 = 1. 31,25$$

$$V_1 = 26$$

c. Larutan Standar 62.5

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

$$V_1 \cdot 1200 = 1. 62,5$$

$$V_1 = 52$$

d. Larutan Standar 125

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

$$V_1 \cdot 1200 = 1. 125$$

$$V_1 = 104$$

e. Larutan Standar 250

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

$$V_1 \cdot 1200 = 1. 250$$

$$V_1 = 208$$

f. Larutan Standar 500

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

$$V_1 \cdot 1200 = 1. 500$$

$$V_1 = 416$$

g. Larutan Standar 1000

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

$$V_1 \cdot 1200 = 1. 1000$$

$$V_1 = 832$$

- Prosedur :

- Dibuat larutan standart BSA dengan pengenceran larutan stok sebagaimana tabel 2. (untuk pembuatan kurva standar BSA):

Tabel 2. pengenceran larutan stok BSA

Larutan stok BSA (µL)	13	26	52	104	208	416	832
PBS (µL)	987	974	948	896	792	584	168
Konsentrasi Protein (ppm)	15.625	31.25	62.5	125	250	500	1000

- Disiapkan tabung reaksi sebanyak 8 buah, isi masing – masing tabung reaksi dengan larutan stok BSA sesuai konsentrasi yang telah ditentukan dan tandai dengan label, kemudian di vortex.
- Diambil 1 mL larutan standar dari masing – masing tabung reaksi, lalu pindahkan kedalam tabung reaksi dan tandai dengan label.
- Disiapkan dialisat sebanyak 1 ml pada tabung reaksi.
- Ditambahkan kedalam masing – masing tabung reaksi dengan 2 ml reagen biuret (1:2), begitu juga dengan protease.
- Inkubasi sampel pada suhu 37⁰C, selama 20 menit dalam inkubator
- Baca absorbansi dengan spektrofotometer uv-vis pada panjang gelombang 540 nm dengan spektrofotometer dan dicatat hasilnya.

- Perhitungan konsentrasi protein

Konsentrasi protein terlarut protease dapat dihitung terhadap persamaan regresi linier kurva standart tirosin dengan Microsoft excel 2007, sebagai berikut ;

$$Y = a + bX$$

Dimana Y = absorbansi

X = konsentrasi

3.3.4.2 Penentuan Aktivitas Protease

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 aktifitas 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*, *phospholibdat-phosphotungstat* (*phosphomolybdotungstate*), menghasilkan *heteropolymolybdenum blue* akibat reaksi gugus aromatik (rantai samping asam amino) terkatalis Cu, yang memberikan warna biru terutama bergantung pada kandungan residu triptopan dan tirosinnya dan dibaca pada panjang gelombang 650 nm.

Untuk setiap sampel yang dianalisis, harus disertai dengan blanko dan standart (lihat tabel 2). Standar yang digunakan adalah tirosin dengan pewarna folin-phenol ciocalteu reagen. Maksud adanya larutan kontrol (larutan standart dan blanko) tersebut untuk menjamin bahwa perubahan yang diamati adalah sebagai akibat kerja katalitik enzim dan bukannya hasil reaksi kimiawi spontan (Trenggono dan Setiaji, 2008).

- Preparasi bahan :
 - Dialisat 1 mL : dialisat khamir laut 2 mg dalam apendorf dilarutkan dalam 1000 μ L pbs (*phosphate buffer saline*)
 - Reagen folin-phenol ciocalteu 2 mL : encerkan reagen dalam aquades dengan perbandingan 1 : 2, kemudian vortex (6 mL)
 - Protein standart 0,5 mL : larutkan standar tirosin dengan aquades pada konsentrasi 1500 ppm (1,5 mg/mL) sebagai larutan stok
 - Kasein 0,5% 1 mL : larutkan 0,005 g kasein dalam 1 mL buffer glisin NaOH 0,05 M pH 9

- Perhitungan kasein 0,5% =

$$\frac{0,5}{100} \times 1 = 0,005 \text{ g dilarutkan 1 mL buffer glisin - NaOH}$$

- Buffer glisin NaOH 0,05 M pH 9 : larutkan 0,00375 g glisin dalam 1 mL aquadest. Larutkan 0,002 g NaOH dalam 1 mL aquades, kemudian campurkan larutan glisin dalam NaOH dan atur pH-nya pada pH 9

- Perhitungan Glisin= $M \times V \times BM$

$$= 0,05 \text{ M} \times 0,001 \text{ L} \times 75,07$$

$$= 0,00375 \text{ g dilarutkan dalam 1 mL aquades}$$

- Perhitungan NaOH = $M \times V \times BM$

$$= 0,05 \text{ M} \times 0,001 \text{ L} \times 40$$

$$= 0,002 \text{ g dilarutkan dalam 1 mL aquades}$$

- 2 mL TCA 10% : larutkan 0,2 g TCA dalam 2 mL aquades.

- Perhitungan TCA = $\frac{10}{100} \times 2 = 0,2 \text{ g dilarutkan dalam 2 mL aquades}$

- Prosedur :

- Tambahkan 0,5 mL tirosin 1500 ppm dalam 1 mL 0,5 kasein dalam buffer glisin NaOH untuk larutan standar
- Tambahkan 0,5 mL aquades dalam 1 mL 0,5 kasein dalam 1 mL 0,5 kasein dalam buffer glisin NaOH untuk larutan blanko
- Inkubasi larutan blanko dan larutan standar dengan suhu 45°C selama 30 menit, kemudian tambahkan TCA 10% sebanyak 2 mL yang berfungsi agar protein yang tidak dibebaskan mengendap
- Disentrifus dengan kecepatan 10000 rpm suhu 4°C selama 10 menit untuk mendapatkan supernatant 1mL
- Siapkan dialisat 1 mL

- Tambahkan dialisat, supernatan blanko dan standar dengan 2 mL reagen folin-phenol ciocalteu (1:2)
- Diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit
- Absorbansi dibaca pada panjang gelombang 650 nm dengan spektrofotometer
- Prosedur pengukuran aktivitas dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Prosedur pengukuran aktivitas protease

Perlakuan	Volume (ml)		
	Sampel	Standar	Blanko
0.5 % kasein dalam glislin NaOH	1	1	1
Ekstrak khamir laut (sentrifuge kecepatan 5000 rpm, suhu 4°C selama 10 menit)	0,5	-	-
Tirosin 1500 ppm	-	0,5	-
Aquades	-	-	0,5
Diinkubasi 45°C selama 30 menit didalam waterbath			
Larutan TCA 10%	2	2	2
Disentrifuge dengan kecepatan 10000 rpm, suhu 4°C selama 10 menit			
Supernatant	1	1	1
Reagen folin phenol	2	2	2
Diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit			
Ditentukan kandungan tirosin dengan kolorimetri 650 nm			

- Perhitungan aktivitas protease :

Aktivitas suatu enzim diukur dari jumlah substrat yang berubah bersama perubahan waktu. Aktifitas spesifik didefinisikan sebagai jumlah unit (U) yang menyatakan jumlah produk yang dihasilkan (μmol) oleh setiap μg protein enzim permenit, sehingga aktivitas spesifik dapat ditentukan dengan membagi unit aktivitas enzim dengan kadar proteinnya. Aktivitas spesifik ini digunakan untuk memonitor enzim dalam proses pemurniannya.

Aktivitas protease dihitung dengan rumus :

$$U = \frac{\text{abs. sampel} - \text{abs. blanko}}{\text{abs. standar} - \text{abs. blanko}} \times \text{fp} \times \frac{1}{t \text{ inkubasi}}$$

Dimana :

U = aktivitas enzim protease (U/mL)

Abs. sampel = nilai absorbansi sampel

Abs. blanko	= nilai absorbansi blanko
Abs. standar	= nilai absorbansi standar
Fp	= faktor pengenceran
T	= lama inkubasi (menit)

3.3.4.3 Penentuan K_M dan V_{maks}

Penentuan K_M dan V_{maks} ditentukan berdasarkan tetapan Michaelis – Menten (Chi *et al.*, 2006). Kecepatan reaksi enzim menunjukkan hubungan kesebandingan dengan konsentrasi substrat. Kecepatan reaksi akan meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi substrat, namun kemudian akan diperoleh data yang menyatakan bahwa pada konsentrasi substrat tinggi tertentu kecepatan reaksi tidak bertambah. Pada kondisi ini konsentrasi substrat menjadi jenuh dan kecepatan reaksi menjadi maksimum yang sering juga disebut sebagai kecepatan maksimum (V_{maks}).

K_M merupakan ukuran konsentrasi substrat agar proses katalitik berlangsung dengan efektif, suatu enzim dengan K_M besar memerlukan konsentrasi substrat yang lebih besar daripada enzim dengan K_M rendah untuk mencapai laju reaksi yang sama.

Prosedur pengukuran K_M dan V_{maks} pada dasarnya sama dengan prosedur pengukuran konsentrasi protein dan aktivitas enzim, yaitu menggunakan standar protein dari tirosin dan BSA. Perbedaannya, pada pengukuran K_M dan V_{maks} digunakan persamaan Michaelis-Menten .

- Preparasi bahan :
 - Pembuatan substrat ikan peperek 10 mL : ikan peperek (beku) dithawing dan direbus pada suhu 90⁰C selama 20 menit bersama pbs dengan jumlah volume yang sama (1;1) untuk menghentikan aktivitas biokimnya (Soussi *et al.*, 2006). Campuran dihancurkan dalam blender selama ± 10 menit, kemudian disentrifuse dengan kecepatan

4500 rpm selama 15 menit (MISTRAL 1000) dalam apendorf 15 mL dan diambil supernatannya

- Dialisat 2,5% : 0,25 mL (dialisat khamir laut 1 mg dalam *eppendorf* dilarutkan dalam 500 μ L pbs (*phosphate buffer saline*))
- Perhitungan dialisat khamir laut 2,5% =

$$\frac{2,5}{100} \times 10 \text{ mL konsentrasi substrat} = 0,25 \text{ mL}$$

- Prosedur:

- Buat konsentrasi substrat ikan peperek dengan pengenceran sebagaimana tabel 4. berikut :

Substrat ikan peperek (mL)	1	1	1	1	1
Aquades (mL)	2	4	6	8	10
Konsentrasi substrat (%)	0,5	0,25	0,16	0,125	0,1

- Hidrolisis dengan menambahkan dialisat sebanyak 2,5%, pada pH 6,5 suhu 34 °C dalam waterbath selama 100 menit
- Hentikan hidrolisis dengan pemanasan pada suhu 80°C selama 20 menit.
- Sentrifus masing masing – masing hidrolisat pada kecepatan 5000 rpm selama 15 menit untuk mendapatkan supernatant
- Masukkan sebanyak 1 mL hidrolisat (sesuai konsentrasi) dalam tabung reaksi, dan beri label kemudian tambahkan reagen folin-phenol ciocalteu dengan perbandingan 1:2
- Masukkan sebanyak 1 mL hidrolisat (sesuai konsentrasi) dalam tabung reaksi, dan beri label kemudian tambahkan reagen biuret dengan perbandingan 1:2
- kemudian inkubasi pada suhu 37 °C, selama 20 menit dalam inkubator

- Baca absorbansi pada panjang gelombang 650 nm dengan spektrofotometer untuk penambahan dengan reagen folin-phenol ciocalteu dan 540 untuk penambahan dengan reagen biuret.

- Perhitungan K_M dan V_{max}

Konstanta Michaelis merupakan cara yang sangat bermanfaat untuk karakterisasi enzim, karena konstanta ini merupakan ukuran dari afinitas enzim-substrat (Trenggono dan Setiaji, 2008).

- Gunakan persamaan regresi linear kurva standart tirosin untuk mendapatkan v dan persamaan regresi linier standar BSA untuk mengetahui konsentrasi substrat [S]
- Tuliskan kebalikan konsentrasi substrat dan kebalikan kecepatan reaksi. Untuk mempermudah perhitungan dibuat tabel sebagai berikut:

Tabel 5 kebalikan konsentrasi substrat dan kebalikan kecepatan reaksi

Konsentrasi (%)	[S] (M)	V (M x menit ⁻¹)	1/[S] (M) ⁻¹	1/v (M x menit ⁻¹) ⁻¹
0,5				
0,25				
0,16				
0,125				
0,1				

- Gambar kurva Lineweaver-Burk yang menyatakan hubungan antara perubahan konsentrasi 1/[s] dengan kecepatan reaksi 1/v, dengan menggunakan 1/[s] sebagai sumbu x dan 1/v sebagai sumbu y.
- K_M dan V_{maks} dapat dihitung terhadap persamaan regresi linier kurva Lineweaver-Burk;

$$\frac{1}{v} = \alpha \frac{1}{[S]} + b$$

- Kurva Lineweaver-Burk memberikan uji cepat untuk kinetika Michaelis-Menten dan dapat mengevaluasi konstanta – konstanta kritik dengan mudah, juga dapat membedakan berbagai jenis inhibisi dan pengendalian enzim.

3.4 Kapasitas Hidrolisis Ikan Peperek

3.4.1 Derajat Hidrolisis

Derajat Hidrolisis ditentukan dengan metode Hoyle dan Meritt (1994). Derajat hidrolisis dapat didefinisikan ssebagai perbandingan persen banyaknya ikatan peptida yang terpecah (N) terhadap total jumlah ikatan peptide persatuan massa (N total) (Souissi *et al.*, 2006).

- Preparasi Bahan :

- Dialisat 2,5% : 0,25 mL (dialisat khamir laut 1 mg dalam *eppendorf* dilarutkan dalam 500 μ L pbs (*phosphate buffer saline*))
- Perhitungan dialisat khamir laut 2,5% =

$$\frac{2,5}{100} \times 10 \text{ mL konsentrasi substrat} = 0,25 \text{ mL}$$

- Sampel hidrolisat ikan peperek (N total); ikan peperek dihidrolisis dengan menambahkan dialisat sebanyak 2,5%, pada pH 6, dan suhu 37 °C dalam waterbath. Hidrolisis dihentikan pada jenjang waktu 0, 25, 50, 75 dan 100 menit (untuk waktu), 2, 3, 4, 5, 6 (untuk pH) dan 34 °C, 37°C, 40 °C, 43 °C, 46 °C (untuk suhu). hidrolisat dari masing – masing jenjang diambil 1 mL untuk analisa N total
- Sampel hidrolisat ikan peperek (N total); 1 mL hidrolisat dari masing – masing jenjang yang telah ditentukan, diambil lalu dicampur dengan 2 mL TCA 20% untuk menghasilkan 10% TCA nitrogen terlarut (*soluble nitrogen*) dan 10% TCA nitrogen tidak terlarut (*insoluble nitrogen*)

dengan cara di sentrifuse pada kecepatan 5000 rpm selama 15 menit. Supernatan dipisahkan dan dianalisa (10% TCA-soluble nitrogen in sample).

- Larutan *Nestler*; larutkan 5% KI dalam air lalu tambahkan HgCl_2 (1:20) sampai terjadi endapan merah yang tak hilang, saring dengan glass wool dan tambahkan 15 g NaOH dalam 60 mL aquades, lalu tambahkan aquades sampai 100 mL
- Larutan KNa tartat; larutkan KNa tartat 500 g dalam 1 L aquades yang dipanaskan, tambahkan 50 mL pereaksi *nestler*. Biarkan selama dua hari lalu disaring

- Prosedur :

- Masukkan masing-masing sampel sebanyak 1 mL dalam labu kjedahl
- Tambahkan 1 g tablet kjedahl, 10 mL H_2SO_4 dan 2 butir batu didih kemudian homogenkan
- Panaskan pada alat dekstruksi sampai warna hijau jernih (1 jam) kemudian dinginkan
- Dinginkan dalam air kemudian saring kedalam labu 250 mL sampai tanda batas kocok
- Ambil 5 mL larutan, masukkan dalam tabung reaksi. Tambahkan 0,5 mL larutan Kna tartat, 0,5 mL larutan nesler, dan 5 mL aquades. Homogenkan dan biarkan selama 10 menit
- Baca absorbansi pada panjang gelombang 490 nm dengan alat spektrometrik-20 untuk mengetahui konsentrasi sampel.

- $$0,0586 = \frac{\sum xy}{\sum x^2}$$

- Perhitungan DH :

DH diukur menggunakan metode hoyle dan merritt (1994). DH dihitung dengan rumus :

$$DH = \frac{(10\% \text{ TCA - nitrogen terlarut dalam sampel})}{\text{Total N dalam sampel}} \times 100$$

Dari hasil DH tersebut kemudian dibuat kurva polynominal yang menyatakan hubungan antara DH dan waktu . DH sebagai sumbu x dan waktu sebagai sumbu Y.

3.4.2 SDS PAGE

Berat molekul protein hidrolisat ikan peperak ditentukan menggunakan SDS-PAGE (*Sodium Deodecyl Sulphate Polyacrilamid Gel Electroforesis*).

SDS – PAGE merupakan teknik elektroforesis yang paling banyak digunakan untuk analisis campuran protein. Pada mekanisme SDS PAGE, protein bereaksi dengan SDS yang merupakan protein 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 ukurannya secara elektroforesis di dalam matrik gel poliakrilamid. Berat molekul protein dapat diukur dengan menggunakan protein standar yang telah diketahui berat molukelnya uji berat molukel ini dilakukan pada sampel hidrolisat protein ikan peperak, ikan peperak yang tidak dihidrolisis marker sebagai pembanding

- Preparasi Bahan :

- Sampel hidrolisat protein ikan peperak dan sampel ikan peperak yang belum dihidrolisis (15 µL) dalam *ependorf* 1,5 mL : tambahkan RSB (*Reducing Sample Buffer*) pada masing – masing dengan perbandingan 1 :1, kemudian panaskan dalam air mendidih selama 5

menit untuk menonaktifkan enzim dan memutus rantai polimer protein.

- Bahan dalam pembuatan sumur gel meliputi pembuatan *separating gel* (12,5%) dan *stacking gel* (12,5%) :

a. Gel Pemisah (*Separating gel*) (12.5%) terdiri dari :

- | | |
|------------------------|--------------|
| ✓ Acrilamida 30% | 2063 μ L |
| ✓ Tris-cL 1.5 M pH 8.8 | 1250 μ L |
| ✓ dd H ₂ O | 1635 μ L |
| ✓ SDS 10% | 50 μ L |
| ✓ APS 10% | 50 μ L |
| ✓ TEMED | 10 μ L |

Separating gel merupakan media penyangga sebagai tempat berimigrasinya molekul protein. Separating gel dibuat dengan mencampurkan bahan-bahan pembuatan separating gel dalam tabung propilen. Penambahan APS dan TEMED harus urut dan tabung propilen digoyang perlahan agar semua bahan tercampur.

Gel poliakrilamid akan dibentuk dari polimer akrilamid dengan suatu cross linking agent yaitu N,N'-methylene bisacrilimide. 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 harus urut.

b. Gel Pengumpul (*stacking gel*) (12,5%) terdiri dari :

- | | |
|------------------------|---------------|
| ✓ Acrilamida 30% | 257,5 μ L |
| ✓ Tris-cL 1.5 M pH 8.8 | 312,5 μ L |
| ✓ dd H ₂ O | 662,5 μ L |
| ✓ SDS 10% | 12,5 μ L |
| ✓ APS 10% | 3,75 μ L |

- ✓ TEMED 2,5 μ L

c. Penyusunan plate pembentuk gel :

- ✓ separating gel dituang kedalam plate pembentuk gel menggunakan mikropipet 1 mL sampai batas yang terdapat pada plat, aquadest kemudian ditambahkan diatas larutan gel (supaya permukaan tidak bergelombang). Aquades dibuang setelah separating gel memadat (\pm 30 menit).
- ✓ Stacking gel 12,5% dituang diatas separating gel. Sebelum membentuk gel, sisir dimasukkan kedalam stacking gel untuk membuat sumuran (10 sumuran).
- ✓ Plate yang sudah berisi gel dimasukkan dalam chamber elektroforesis dan running buffer dituang dalam chamber hingga bagian atas dan bawah dari gel terendam.

• Prosedur :

- Dimasukkan masing – masing sampel dan marker kedalam sumuran gel SDS-PAGE sebanyak 15 μ L dengan mikropipet
- Hubungkan chamber elektroforesis dengan arus listrik dan running sampel pada arus 20 A dan voltase 220 V selama 75 menit, 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. Running sampel dikatakan selesai apabila warna pelacak atau *tracking dye* mencapai jarak 0,5 cm dari dasar gel atau kurang lebih 75 menit.
- Running buffer dipisahkan dan gel diambil dari plate pembentuk gel
- Gel yang telah diambil dari plate direndam dalam 25 mL larutan staining selama kurang lebih 2 jam, kemudian dibilas dengan air dan

direndam dalam 50 mL larutan destaining selama kurang lebih 1 malam atau sampai pita protein terlihat jelas, dalam tahap ini larutan staining digunakan untuk mewarnai protein dan larutan destaining untuk menghilangkan warna pada gel dan memperjelas pita protein yang terbentuk

- Setelah gel (*staining gel*) 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*. Kemudian dapat ditentukan mobilitas relatif protein untuk kemudian ditentukan berat molekulnya.
- Dari setiap nilai R_f yang diperoleh, dihitung berat molekulnya dengan bantuan persamaan garis linier dari kurva standart berat molekul marker
- Dicatat hasilnya dalam tabel
- Perhitungan :

$$R_f = \frac{\text{jarak pergerakan protein dari tempat awal}}{\text{jarak pergerakan warna pelacak dari tempat awal}}$$

3.4.3 Analisa Profil Asam Amino dengan HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*)

Profil asam amino ditentukan berdasarkan perbedaan afinitas molekul protein terhadap zat padat tertentu. Cairan yang akan dipisahkan merupakan fase cair dan zat padatnya merupakan fase diam (stasioner). Dengan bantuan detector serta integrator akan mendapatkan kromatogram. Kromatogram memuat waktu lambat serta tinggi puncak suatu senyawa. Alat yang digunakan

dalam menganalisa profil asam amino dalam HPLC. Prinsip kerja HPLC adalah dansil klorida (5-dimetilamino-1-naftalen sulfonil klorida) digunakan untuk derivatisasi asam – asam amino, menghasilkan derivat dansil yang bersifat fluoresen, kemudian akan dipisahkan dengan prosedur kromatografi kolom fase dibalik (*reserved phase column chromatograph*). Hasil yang diperoleh dideteksi dan diukur dengan suatu detector fluoresen.

Kondisi HPLC yang digunakan dalam penelitian ini yaitu : kolom : Lichrospher 100 RP 18 (5 μm), panjang kolom 125 x 4,0 mm, flow rate : 1ml/menit, fase gerak yaitu; A. CH_3OH : 50 mM natrium asetat : THF; pH 6,8 (2;96;2), B. 65% CH_3OH , Detektor : Fluorecen Shimadzu RF-138.

- Preparasi Bahan :

- Sampel hidrolisat ikan peperek; Substrat ikan peperek sebanyak 2 mL dihidrolisis menggunakan dialisat khamir laut 2,5% selama 100 menit, pH 6,4 pada suhu 34 $^{\circ}\text{C}$.
- Sampel ikan peperek ; 60 mg ikan peperek ditambahkan 4 mL HCl 6N dipanaskan selama 24 jam dengan suhu 110 $^{\circ}\text{C}$, kemudian dinetralkan (pH 7) dengan NaOH 6 N dan disaring dengan kertas saring Whatman 0,2 μm .

- Prosedur Analisis Asam Amino:

- Diambil hidrolisat sebanyak 25 μL dan dimasukkan dalam kuvet
- Ditambahkan larutan OPA sebanyak 300 μL . 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 analisa relatif cepat.

- Diaduk hingga homogen selama 5 menit
- Diinjeksikan sebanyak 20 μL kedalam HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*).

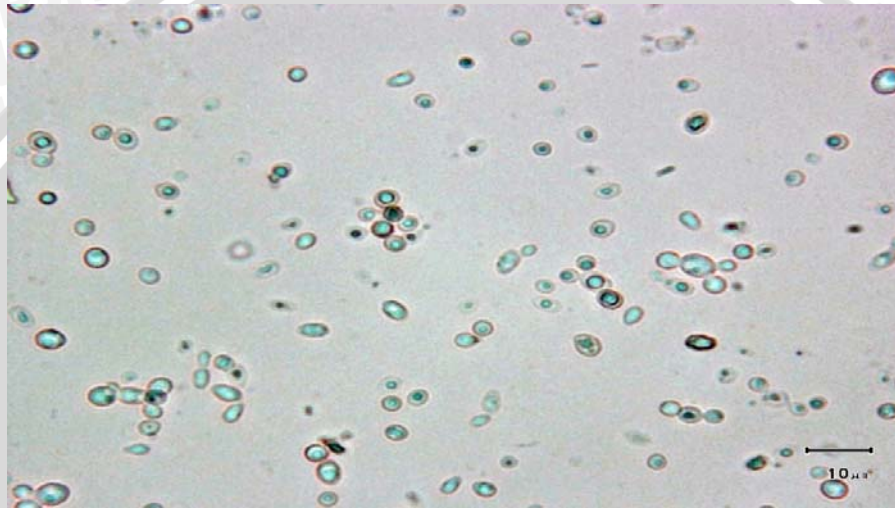
UNIVERSITAS BRAWIJAYA



4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Sel Khamir Laut

Dihasilkan 2-3 L stok khamir laut dari 15 L air laut dengan menggunakan pupuk daun larut air dengan merek Hortigro. Sel khamir laut dengan perbesaran 400x dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Sel khamir laut

Gambar 2 memperlihatkan khamir laut mempunyai beberapa bentuk diantaranya bundar dan oval. Jay (1992) menambahkan khamir mempunyai ukuran 5-8 μ m lebih besar dari bakteri, berbentuk oval memanjang, elips atau bulat.

4.2 Karakteristik Protease Khamir laut

Karakteristik dialisat khamir laut meliputi aktivitas protease, konsentrasi protease ekstrak khamir laut, konstanta Michaelis-Menten (K_M) dan kecepatan maksimum (V_{maks}). Perbandingan karakteristik hasil ekstrak kasar khamir laut dengan dialisat khamir laut dapat dilihat dalam Tabel 6 :

Tabel 6. Perbandingan karakteristik ekstrak kasar khamir laut dengan dialisat khamir laut yang telah dimurnikan

No	Karakteristik	Nilai ekstrak kasar	Nilai dialisat khamir laut
1	Konsentrasi protein (mg/mL)	2,2175	65,5
2	Aktivitas enzim (mU/mL/menit)	21,5	50
3	V_{maks} (mmol/min/mg)	15,405	0,080142653
4	K_M (mM)	$2,771632 \times 10^3$	$0,653594771 \times 10^3$

4.2.1 Konsentrasi Protein Protease

Tabel 5 memperlihatkan konsentrasi protein dialisat khamir laut sebesar 65,5 mg/mL, nilai ini lebih tinggi dibanding nilai konsentrasi ekstrak kasar khamir laut yang mempunyai nilai sebesar 2,2175 mg/mL. Hal ini dimungkinkan karena supernatan khamir laut dilakukan proses pemurnian dengan dialisis sehingga terbebas dari kontaminan. Dialisis digunakan untuk meningkatkan konsentrasi enzim (Naiola dan Widhyastuti, 2007), dan sering digunakan untuk memisahkan kontaminan dengan ukuran molekul kecil. Kontaminan dengan berat molekul rendah akan keluar (Matthews *et al.*, 2000). Schmidt *et al.*, (2007) menambahkan kantung selofan dengan *molecular weight cutoff* (MWCO) 25 kDa dapat digunakan untuk menghilangkan ion nitrogen, asam amino, atau peptida yang berukuran kecil. Protease merupakan protein yang memiliki berat molekul lebih besar dari 12 kDa (Sindumarta, 1999). Sehingga dimungkinkan protein non enzim dan kontaminan yang berukuran kecil (BM < 25 kDa) ikut keluar dari kantung selofan sehingga konsentrasi protein dialisat khamir laut menjadi lebih pekat.

4.2.2 Aktivitas Protease Dialisat Khamir Laut

Tabel 5 memperlihatkan aktivitas protease pada dialisat khamir laut sebesar 50 mU/menit/mL aktivitas ini lebih tinggi dibanding dengan aktivitas

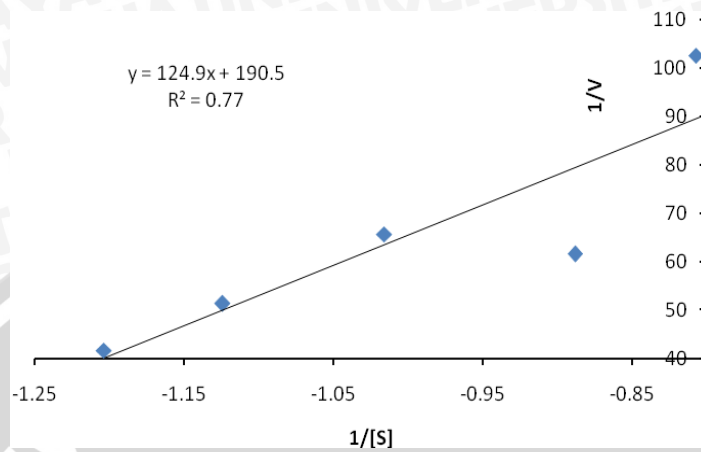
ekstrak kasar khamir laut yang mempunyai nilai sebesar 21,5 mU/menit/mL. Bila dibandingkan dengan aktivitas protease dari ekstrak murni khamir laut *Aurobasidium pullulans*, aktivitas dialisat khamir laut ini masih kecil. Ma *et al.*, (2007) melaporkan bahwa ekstrak murni khamir laut *Aurobasidium pullulans* strain 10 yang diisolasi dari sedimen pantai di Qingdao, China, memiliki aktivitas protease 623,1 U/mg; 7,2 U/mL.

Tingginya aktivitas pada dialisat khamir laut dimungkinkan karena dilakukan proses pemurnian (dialisis). Pemurnian enzim pada dialisat khamir laut dilakukan dengan tujuan untuk memisahkan enzim dari pengotor komponen lain. Hal ini diperlukan untuk menghilangkan senyawa lain yang mengganggu sisi aktif (Othmer, 1987). Dialisis sering digunakan untuk memisahkan kontaminan dengan ukuran molekul kecil (Matthews *et al.*, 2000). Sedangkan rendahnya aktivitas dari dialisat khamir laut dibandingkan dengan penelitian Ma *et al.*, (2007), dimungkinkan karena masih terdapat kontaminan (inhibitor) pada dialisat khamir laut yang menghambat sisi aktif enzim dimana menyebabkan terjadinya persaingan antara inhibitor dengan substrat terhadap bagian aktif enzim. Aktivitas enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor salah satunya adalah inhibitor. Terbentuknya kompleks enzim inhibitor (EI) akan menurunkan aktivitas enzim terhadap substrat (Poedjiadi, 1994).

4.2.3 V_{maks} dan K_M Protease Khamir Laut

Tabel 6 memperlihatkan bahwa V_{maks} dan nilai K_M dialisat khamir laut lebih kecil dibandingkan dengan ekstrak kasar khamir laut dan lebih besar dibandingkan dengan penelitian Ma *et al.*, (2007) melaporkan bahwa ekstrak murni khamir laut *Aurobasidium pullulans* strain 10 yang diisolasi dari sedimen pantai di Qingdao, China, melalui kromatografi *ion exchange* yang memiliki K_M

dan V_{maks} sebesar 0,25 mg/ml dan 0,0286 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$. Kurva Lineweaver – Burk dialisat khamir laut dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. Kurva Lineweaver – Burk dialisat khamir laut

Rendahnya K_M dan V_{maks} dimungkinkan karena dialisat khamir laut yang digunakan lebih murni. Rendahnya nilai tersebut menunjukkan efisiensi sisi aktif enzim dalam mengikat substrat dimana pada sisi aktif enzim tidak terjadi hambatan oleh kontaminan. Sindumarta (1999), menambahkan sisi aktif enzim seringkali berupa suatu kantung atau celah yang dikelilingi rantai samping asam amino untuk mengikat substrat dan rantai samping yang berperan sebagai katalis. Ketaren (1990), menjelaskan bahwa kinetika reaksi enzimatik sangat dipengaruhi oleh kemurnian substrat. Jadi afinitas protease dialisat khamir laut yang digunakan dalam penelitian mempunyai afinitas lebih tinggi dibandingkan dengan protease ekstrak kasar khamir laut.

Nilai K_M dan V_{maks} dari dialisat khamir laut lebih besar bila dibandingkan dengan penelitian Ma *et al.*, (2007), hal ini dikarenakan proses pemurnian yang berbeda sehingga memiliki kemampuan seleksi enzim yang berbeda. Pada dialisis dimungkinkan kemurnian enzim masih rendah karena hanya mampu menghilangkan senyawa dengan berat molekul rendah dan kurang efisien dalam menghilangkan kontaminan yang dapat mengganggu sisi aktif enzim dan

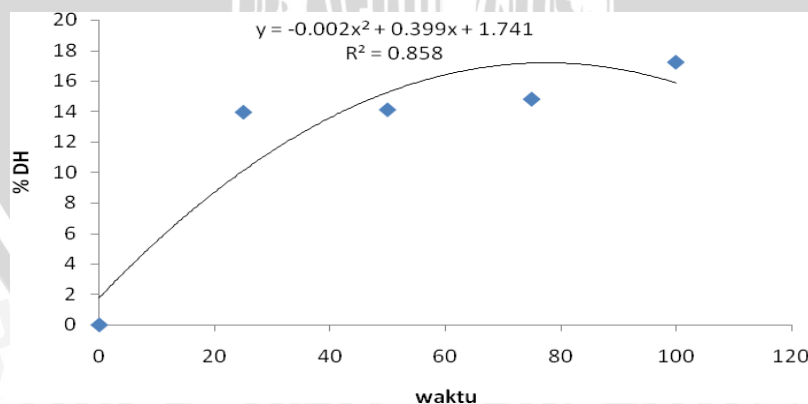
menyebabkan tidak terjadinya kompleks enzim – substrat. Pada dialisis juga masih terdapat sisa garam hasil pengendapan, serta lolosnya protein enzim yang mempunyai molekul lebih kecil dari membran. Menurut Trenggono dan Setiadji (2008), metode dialisis berguna untuk solut BM tinggi tetapi tidak sesuai untuk konsentrasi akromolekul dalam ukuran range yang lebih kecil. Ini disebabkan keterbatasan permeabilitas dari membran selofan. Sedangkan pemurnian dengan kromatografi *ion exchange* memisahkan senyawa sesuai dengan sifat alami dan derajat muatan ioniknya, sehingga lebih efisien dalam menghilangkan kontaminan serta meminimalkan hilangnya protein enzim. Kromatografi pertukaran ion memisahkan protein berdasarkan pada muatan bersih protein dan pada kekuatan relatif dari muatan bersih protein tersebut (Widhyastuty, 2007)

4.3 Kapasitas Dialisis Khamir Laut dalam Hidrolisis Ikan Peperek

4.3.1 Derajat Hidrolisis (DH)

4.3.1.1 Pengaruh Waktu

Pengaruh waktu hidrolisis terhadap derajat hidrolisis (%) protein ikan peperek yang dihidrolisis dengan dialisis khamir laut dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Pengaruh waktu hidrolisis terhadap derajat hidrolisis (%)

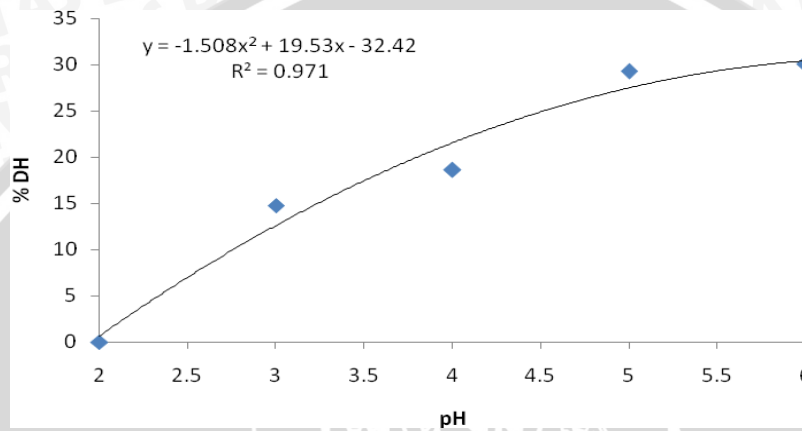
Gambar 4 memperlihatkan bahwa waktu hidrolisis dialisat khamir laut lebih lama dibanding ekstrak kasar khamir laut (84,5 menit). Waktu hidrolisis inipun lebih lama dibanding hidrolisis ikan layang (*Decapterus maruadsii*) dengan menggunakan *flavourzyme* (60 menit) (Thiansilakul *et al.*, 2006). Hal ini menunjukkan pada 84,5 menit, sisi aktif dialisat khamir laut telah terjadi kontak (berikatan) dengan protein ikan peperek yang menyebabkan protein ikan tersebut terhidrolisis. Hubungan atau kontak antara enzim dengan substrat menyebabkan terjadinya kompleks enzim-substrat. Kompleks ini merupakan kompleks yang aktif, yang bersifat sementara dan akan terurai lagi apabila reaksi yang diinginkan telah terjadi (Poedjiadi dan Supriyanti, 2007).

Gambar 4 juga memperlihatkan bahwa derajat hidrolisis dialisat khamir laut dalam menghidrolisis ikan peperek lebih besar dibanding ekstrak khamir laut (6%). Hal ini dimungkinkan karena waktu yang digunakan dialisat khamir laut dalam menghidrolisis lebih lama. Menurut Whitaker (1972), makin lama waktu inkubasi makin banyak enzim yang terdifusi kedalam substrat sehingga produk yang dihasilkan akan semakin besar pula. Winarno (1995) menambahkan bahwa peningkatan waktu inkubasi akan meningkatkan kesempatan enzim untuk memecah substrat sehingga hasil hidrolisis semakin meningkat.

4.3.1.2 Pengaruh pH

Pengaruh pH hidrolisis terhadap derajat hidrolisis (%) protein ikan peperek yang dihidrolisis dengan dialisat khamir laut dapat dilihat pada Gambar 5. Gambar 5 memperlihatkan bahwa pH hidrolisis dialisat khamir laut lebih asam dibanding ekstrak kasar khamir laut (pH 9). pH hidrolisis ini juga sama dengan hidrolisis ikan sarden (*Sardinella aurita*) dengan menggunakan enzim alkalase (pH 6) (Soussi *et al.*, 2005). Hal ini menunjukkan pada pH 6,4, sisi aktif dialisat khamir laut, yaitu gugus yang berperan pada proses katalitik melepaskan

protonnya sehingga dialisat khamir laut menjadi aktif dan dapat berikatan dengan protein ikan peperek. Menurut Sumardi dan Lengkana (2009), Pada sisi aktif enzim yang mengalami protonisasi, gugus yang berperan dalam proses katalitik akan melepaskan ion hidrogen sehingga sisi aktif enzim akan menjadi bermuatan negatif dan akan berikatan dengan substrat yang bermuatan positif.

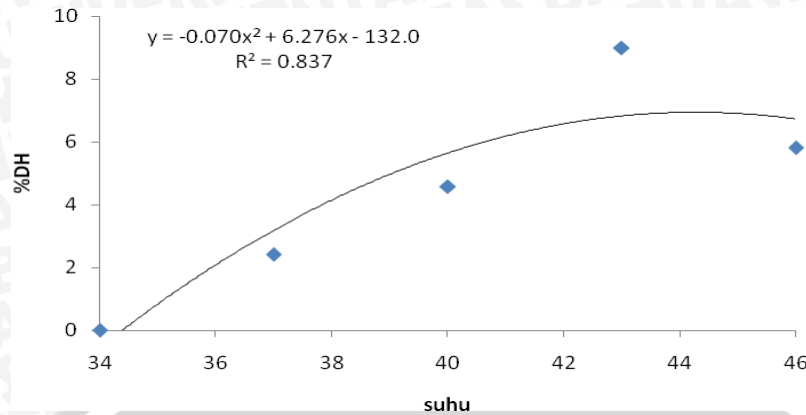


Gambar 5. Pengaruh pH hidrolisis terhadap derajat hidrolisis (%)

Gambar 5 juga memperlihatkan bahwa derajat hidrolisis dialisat khamir laut dalam menghidrolisis ikan peperek lebih besar dibanding ekstrak khamir laut (6%). Hal ini dimungkinkan karena pH 6,47 merupakan pH optimasi dialisat khamir laut dalam menghidrolisis. Semua enzim mempunyai kisaran pH optimum. Ketika pH bergeser terlalu jauh dari pH optimumnya, aktivitas enzim akan turun dan enzim mungkin menjadi rusak (Martin *et al.*, 1983). Subandi dan Susanti (2007) menambahkan, bila pH naik maka gugus tersebut akan kehilangan proton sehingga aktivitas menjadi turun.

4.3.1.3 Pengaruh Suhu

Pengaruh suhu hidrolisis terhadap derajat hidrolisis (%) protein ikan peperek yang dihidrolisis dengan dialisat khamir laut dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Pengaruh suhu hidrolisis terhadap derajat hidrolisis (%)

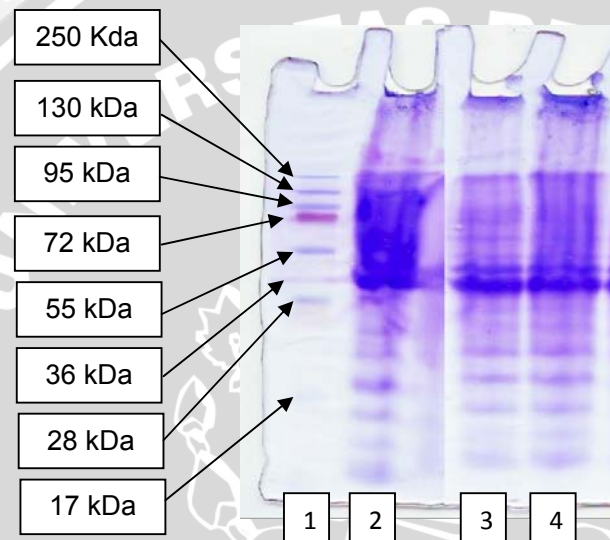
Gambar 6 memperlihatkan bahwa suhu hidrolisis dialisat khamir laut lebih rendah dibanding ekstrak kasar khamir laut (45°C). Hal ini menunjukkan pada suhu 44°C, telah terjadi peningkatan energi kinetik molekul dialisat khamir laut sehingga peluang terjadinya tumbukan antara molekul dialisat khamir laut dan protein ikan peperek semakin besar. Meryandini *et al.*, (2009) menyebutkan, bertambahnya energi kinetik akan mempercepat gerak vibrasi, translasi, dan rotasi baik enzim maupun substrat. Hal ini akan memperbesar peluang enzim dan substrat bereaksi. Akibatnya semakin besar pula peluang molekul enzim berikatan dengan substrat sehingga produk yang dihasilkan semakin banyak (Roosdiana, 2003).

Gambar 6 juga memperlihatkan bahwa derajat hidrolisis dialisat khamir laut dalam menghidrolisis ikan peperek lebih besar dibanding ekstrak khamir laut (6%). Hal ini dimungkinkan karena pada suhu inilah aktivitas enzim mencapai optimal sehingga kecepatan reaksi enzim naik karena energi kinetik bertambah. Totoro *et al.*, (2000) menambahkan suhu yang lebih tinggi diatas suhu optimasi dapat menyebabkan enzim mengalami penurunan aktifitasnya, bahkan suhu yang terlalu tinggi akan menyebabkan enzim terdenaturasi dan inaktif. Dalam suatu reaksi enzimatik, setelah suhu optimal tercapai laju reaksi akan turun. Hal

ini terjadi karena perubahan struktur enzim yang menyebabkan penurunan laju katalitik (Mallette *et al.*, 1968).

4.3.2 Berat Molekul (SDS-PAGE)

Profil pita peptida ikan peperek dan hidrolisat protein ikan yang dihidrolisis dengan dialisat khamir laut dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. 1. *Marker prestained protein ladder*, 2. Ikan peperek, 3. Hidrolisat protein ikan dengan pengenceran, 4. Hidrolisat protein ikan tanpa pengenceran

Gambar 7 memperlihatkan pita peptida pada ikan peperek tanpa hidrolisis tampak tebal karena kadar protein masih besar. Pita pada hidrolisat tanpa pengenceran sudah mulai terlihat adanya pemisahan peptida satu dengan yang lain dan pada hidrolisat dengan pengenceran terlihat semakin sedikit pita-pita peptidanya. Hal ini menunjukkan bahwa telah terjadi proses hidrolisis selama penambahan dialisat khamir laut, sehingga memecah ikatan protein menjadi peptida dengan berat molekul kecil. Protease bekerja sebagai katalis dalam reaksi pemecahan molekul protein dengan cara hidrolisis, pemecahan protein pada tempat-tempat tertentu dalam molekul protein dan biasanya tidak

mempengaruhi gugus yang terletak diujung molekul (Poedjadi dan Supriyanti, 2007). Herry *et al.*, (2002) menyebutkan protease selama hidrolisis memecah ikatan-ikatan yang ada pada protein menjadi tidak kompak dan berat molekulnya menjadi rendah sehingga mudah larut dalam air.

Berat molekul pita peptida ikan peperek dan hidrolisat protein ikan peperek yang dihidrolisis dengan dialisat khamir laut laut dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 7. Berat Molekul (kDa) pita peptida ikan peperek dan hidrolisat protein ikan peperek yang dihidrolisis dengan dialisat khamir laut

No	Ikan Peperek	HPI tanpa Pengenceran	HPI dengan Pengenceran 1X
1.	157,1036	157,1036	157,1036
2.	125,6679	125,6679	125,6679
3.	-	93,31293	93,31293
4.	74,64143	-	-
5.	-	69,28821	69,28821
6.	59,70602	59,70602	59,70602
7.	51,44899	51,44899	51,44899
8.	41,15428	41,15428	41,15428
9.	32,91949	32,91949	32,91949
10.	22,69081	26,33245	26,33245
11.	15,64037	15,64037	15,64037
12.	10,78062	10,78062	10,78062
13.	7,430888	-	-
14.	5,121977	5,944001	5,944001
15.	-	4,097092	4,097092
16.	3,530486	-	-
Jumlah	13 asam amino	13 asam amino	13 asam amino

Tabel 7 memperlihatkan bahwa beberapa berat molekul pita peptida ikan peperek tidak muncul tetapi setelah dilakukan hidrolisis berat molekul pita peptida tersebut menjadi muncul, begitu juga sebaliknya. Hal ini dimungkinkan karena berubahnya struktur molekul asam amino akibat perebusan pada pembuatan hidrolisat protein ikan. Pemanasan diduga dapat menurunkan ketebalan pita protein dengan molekul besar dan meningkatkan jumlah bagian-bagian protein yang tertinggal dalam pemisahan protein (de la Fuente *et al.*,

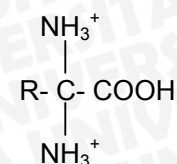
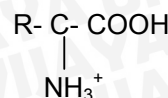
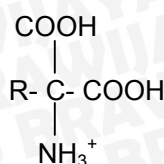
2004). Pita-pita protein yang hilang kemungkinan berubah menjadi polipeptida yang lebih pendek (Riyanto, 2006).

Pita peptida hidrolisat protein ikan peperek yang dihidrolisis dengan dialisat khamir laut lebih banyak dibandingkan dengan hidrolisat protein ikan peperek yang dihidrolisis dengan ekstrak kasar khamir laut yang mempunyai 5 pita protein pada berat molekul 47,62977248 kDa, 35,95818004 kDa, 24,20919152 kDa, 17,71474697 kDa, 15,15347676 kDa (Ahmad, 2010), hal ini dimungkinkan pada ekstrak kasar khamir laut masih terdapat kontaminan sehingga interaksi kompleks antara substrat dan sisi aktif enzim hanya mampu menghidrolisis protein ikan peperek dengan jumlah yang lebih sedikit. Enzim tertentu hanya memutuskan ikatan tertentu yang secara fisik cocok dengan dimensi dan hal ini dapat menghambat proses hidrolisis (Peterson, 1981).

4.3.3 Profil Asam Amino dengan HPLC

Kromatogram HPLC pada standar asam amino, asam amino ikan peperek dan asam amino hidrolisat ikan peperek dapat dilihat pada Gambar 8, Gambar 9, dan Gambar 10.

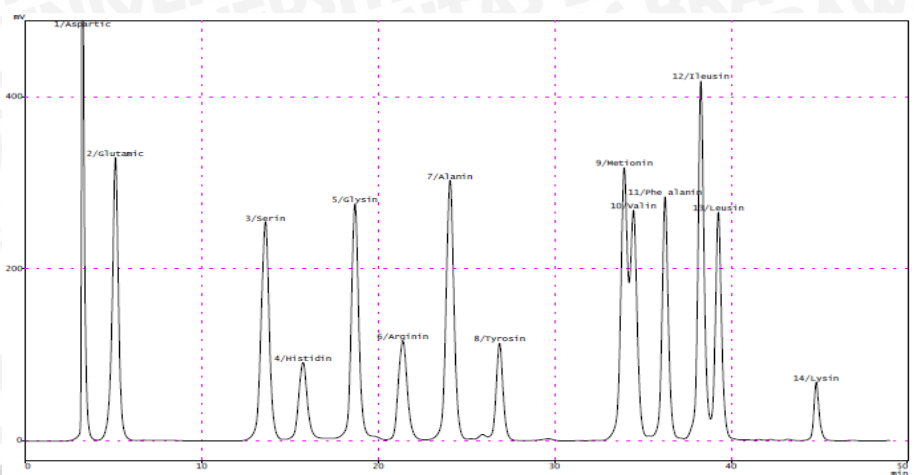
Gambar 8 memperlihatkan bahwa asam amino aspartat dan glutamat muncul terlebih dahulu dibanding asam amino lainnya. Menurut Sumartini dan Kantasubrata (2001), didalam larutan asam amino berada dalam bentuk amfoter $R-CH(NH_3^+)COO^-$ dan sebelum dimasukkan kedalam kolom penukar kation, pH larutan asam amino tadi diatur dengan HCl pekat hingga mencapai pH 2,2. Dalam suasana asam, molekul –molekul ketiga jenis asam amino (asam amino asam, netral, dan basa) berada dalam bentuk – bentuk sebagai berikut



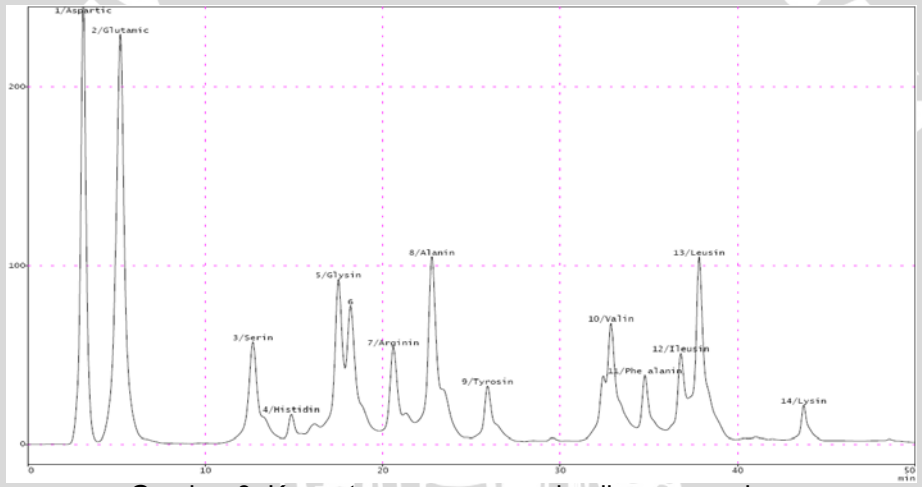
Mekanisme pemisahan dari resin penukar kation ini (SO_3Na^+) terjadi karena adanya pertukaran ion antara gugus amino yang terprotonasi (NH_3^+) dengan gugus Na^+ dari resin. Asam amino basa mempunyai interaksi yang paling kuat dengan kolom karena memiliki gugus NH_3^+ yang relatif banyak dibanding dengan asam amino netral dan asam amino asam. Asam amino dengan gugus aromatik mempunyai interaksi yang lebih besar pada kolom. Hal ini dimungkinkan karena adanya interaksi tambahan antara gugus aromatik dari resin dengan gugus aromatik dari asam amino tersebut. Setelah semua jenis asam amino terikat pada kolom dengan kekuatan yang berbeda, maka dilakukan kemudian proses elusi gradien untuk mengeluarkan asam amino tadi satu persatu dari kolom. Digunakan larutan buffer Na atau Li sitrat dengan berbagai harga pH yang diatur makin tinggi secara bertahap dan kontinyu. Asam amino lemah pada kolom akan terelusi lebih dahulu, sedangkan asam amino basa mempunyai interaksi paling kuat dengan kolom akan keluar paling lambat.

Gambar 9 memperlihatkan hasil analisa profil asam amino ikan peperek yang terdeteksi sebanyak 13 asam amino, asam amino esensial yang ada pada ikan peperek adalah histidin, arginin, valin, fenilalanin, isoleusin, leusin, dan lisin.

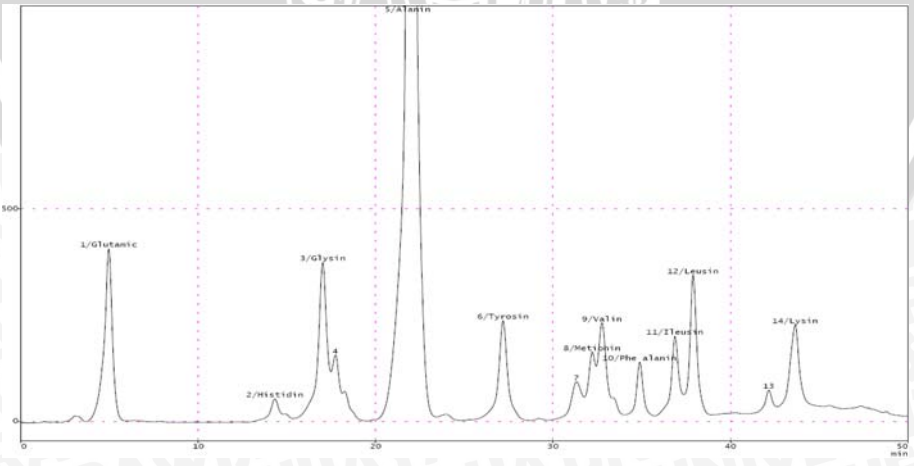
Gambar 10 memperlihatkan hasil analisa profil asam amino hidrolisat ikan peperek yang terdeteksi sebanyak 11 asam amino, dan asam amino esensial yang terdapat pada hidrolisat ikan peperek adalah histidin, metionin, valin, fenilalanin, isoleusin, leusin, dan lisin.



Gambar 8. Kromatogram standar asam amino



Gambar 9. Kromatogram asam amino ikan peperek



Gambar 10. Kromatogram asam amino Hidrolisat ikan peperek dengan dialisat khamir laut

Kandungan (gr/100 gr) dari masing – masing asam amino dapat dilihat pada Tabel 8.

Tabel 8. Kandungan asam amino pada ikan peperek dan HPI (ikan peperek yang dihidrolisis dengan dialisat khamir laut dan ikan peperek yang dihidrolisis dengan starter khamir laut *mix*).

No	Profil Asam Amino	Kandungan (gr/100gr)		
		Ikan peperek	HPI	
			Dialisat khamir laut ^{*)}	Starter khamir laut <i>mix</i> ^{**)}
1	Aspartat	123,6129	-	0,01318
2	Glutamat	149,1699	14,31737	0,01707
3	Serin	41,5366	-	0,00336
4	Histidin	12,8285	6,78384	0,00237
5	Glisin	43,3325	14,52236	0,00814
6	Arginin	64,3347	-	0,00385
7	Alanin	66,2628	76,52293	0,01024
8	Tirosin	55,8608	27,71606	0,00226
9	metionin	-	4,38449	0,00629
9	Valin	80,7133	10,56144	0,01413
10	Fenilalanin	28,1804	4,46176	0,00535
11	Isoleusin	23,5409	5,21725	0,00882
12	Leusin	92,3358	12,52189	0,01020
13	Lisin	57,4965	47,76641	0,00002

^{*)} Hasil Penelitian

^{**)} Faharudin (2002)

Tabel 8 memperlihatkan bahwa tidak terdapat asam amino aspartat, serin, arginin pada hidrolisat protein ikan peperek tetapi muncul asam amino metionin pada hidrolisat protein ikan. Hal ini dimungkinkan karena asam amino tersebut rusak atau terdegradasi oleh protease asam yang kemudian menjadi komponen asam amino lain. Karlson (1975), menyebutkan protease asam termasuk golongan enzim protease endopeptidase. Golongan enzim ini menyerang protein dari tengah molekul dan sering juga disebut sebagai enzim proteinase karena menyerang polipeptida tinggi atau protein. Protease asam bersifat kurang khas namun lebih mengutamakan serangan pada titik asam amino aromatik atau asam amino asam. Hasil degradasi golongan enzim endopeptidase ini adalah oligopeptida atau fragmen kecil protein. metionin awal ini tidak akan terikut dalam protein yang kelak terbentuk karena dibuang dalam proses pascatranskripsi.

Biosintesis metionin dilakukan oleh tumbuhan dan mikrobia menggunakan asam aspartat dan sistein sebagai bahan baku (sistein juga dibuat dari metionin, suatu proses dapat balik) (Wikipedia, 2011).

Tabel 8 juga memperlihatkan konsentrasi kandungan asam amino pada hidrolisat protein ikan yang dihidrolisis dengan dialisat khamir laut lebih tinggi dibanding hidrolisis dengan starter khamir laut *mix*, hal ini dimungkinkan karena protease yang terkandung dalam dialisat khamir laut cenderung bekerja seperti protease asam sehingga lebih spesifik dan maksimal dalam menghidrolisis protein ikan peperek. Menurut Barrett *et al.*, (2004), protease asam mempunyai dua residu asam aspartat pada sisi aktifnya. Pada katalisis dengan asam protease terjadi 2 transfer proton secara *stimultan*, pertama dari molekul air pada dua ikatan gugus karboksil dan kedua ikatan karbonil oksigen dari pemecahan substrat pada ikatan CO-NH.

Adapun skor asam amino esensial ikan peperek yang dihidrolisis dengan dialisat khamir laut dan ikan peperek yang dihidrolisis dengan ekstrak kasar khamir laut (Ahmad, 2010) berdasarkan NRC dan FAO dapat dilihat pada Tabel 9.

Tabel 9. Skor asam amino esensial HPI berdasarkan NRC dan FAO

No	Profil Asam Amino	Skor Asam Amino Hidrolisat Protein Ikan Peperek			
		NRC		FAO	
		Dialisat Khamir Laut	Ekstrak Kasar Khamir Laut	Dialisat Khamir Laut	Ekstrak Kasar Khamir Laut
1	Histidin	3,230401	0,068501	3,3919205	0,071926
2	Arginin	-	0,244127	-	0,068981
3	Metionin	1,414353	0,044927	1,25271314	0,039792
4	Valin	2,933734	0,145531	1,94860517	0,096663
5	Fenilalanin	0,686424	0,094598	1,04003683	0,143330
6	Isoleusin	2,086901	0,140729	1,30431325	0,087956
7	Leusin	3,794513	0,176947	1,78884143	0,083442
8	Lisin	8,380071	0,069928	8,68480182	0,072471
9	Threonin	-	-	-	-
10	Triptofan	-	-	-	-

Tabel 9 memperlihatkan persentase asam amino hidrolisat protein ikan yang dihidrolisis dengan dialisat khamir laut berdasarkan NRC yang merupakan

referensi kebutuhan asam amino esensial untuk ikan dan FAO yang merupakan referensi kebutuhan asam amino esensial untuk manusia mempunyai nilai yang lebih besar dibanding ekstrak kasar Khamir laut. Menurut Indratwari (2010), skor asam amino yang baik adalah sama dengan atau diatas 1. Saraswati (2011), menambahkan skor asam amino tertinggi adalah 1,0 dan nilai terendah adalah 0. Semua asam amino pada hidrolisat protein ikan yang dihidrolisis dengan dialisat khamir laut mempunyai nilai 1 kecuali asam amino fenilalanin, treonin, dan triptofan sehingga apabila hirolisat digunakan sebagai pakan atau pangan, maka bahan pangan atau pakan juga kekurangan 3 asam amino tersebut dengan demikian untuk memenuhi kebutuhan asam amino ikan dan manusia harus memasukkan fenilalanin, treonin, dan triptofan dari sumber lain.

Bagi manusia histidin merupakan asam amino yang esensial bagi anak. Fungsi Histidin menjadi prekursor histamin, suatu amina yang berperan dalam sistem saraf, dan karnosin, suatu asam amino. Leusin berperan dalam menjaga perombakan dan pembentukan protein otot. Fenilalanin bersama-sama dengan taurin dan triptofan merupakan senyawa yang berfungsi sebagai penghantar atau penyampai pesan (*neurotransmitter*) pada sistem saraf otak (Hidayat, 2011).

Tingginya skor asam amino ikan peperek yang dihidrolisis dengan dialisat khamir laut dibanding ikan peperek yang dihidrolisis dengan ekstrak kasar khamir laut dimungkinkan karena rendahnya kontaminan yang menghambat sisi aktif dialisat khamir laut sehingga dialisat khamir laut bekerja lebih maksimal dalam menghidrolisis protein ikan peperek. Ekananda (2007) menyebutkan, molekul kompleks yang terjadi antara enzim dengan substrat akan menghasilkan produk sedangkan reaksi molekul kompleks enzim dengan inhibitor tidak akan menghasilkan produk. Kemungkinan lain adalah kompleks enzim-inhibitor tersebut sangat stabil sehingga lama-kelamaan enzim tersebut habis terkonsumsi dan fungsinya sebagai katalis menjadi rusak.

5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

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

- Protease dialisat khamir laut mempunyai karakteristik; konsentrasi protein 65,5 mg/L, aktivitas enzim 50 mU/mL, serta V_{maks} 0,080142653 mmol/min/mg, dan nilai K_M sebesar $0,653594771 \times 10^3$ mM.
- Dialisat khamir laut dapat menghidrolisis ikan peperek secara maksimal pada pH 6,47, 99,75 menit, suhu 44,83°C, dengan menghasilkan peptida 157,1036-4,097092 kDa dan 11 asam amino, asam amino esensial yang terdapat pada hidrolisat ikan peperek adalah histidin, metionin, valin, fenilalanin, isoleusin, leusin, dan lisin.

5.2 Saran

Perlu penelitian lebih lanjut tentang pemurnian protease dari khamir laut yang meliputi teknik pemurnian

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad R., 2010. *Karakteristik Ekstrak Kasar Khamir Laut dalam Hidrolisis Protein Ikan Peperek (Leiognathus sp.)*. Skripsi. FPIK. Universitas Brawijaya. Malang. Hal 24-50
- Ariyani, F., Saleh., M. Tazwir dan Nuruk. H. 2003. Optimasi Proses Produksi Hidrolisat Protein Ikan (HPI) dari Ikan Mujair (*Oreochromis mossambicus*). *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia* Volume 9 Nomor 5. Hal 11-18
- Aulanni'am. 2005. *Protein dan Analisisnya*. Citra Mentari Group. Malang. Hal 29-56
- Baker, R.W., 2000. *Membrane technology and applications*. The McGraw-Hill Companies, USA. Chapter 1,2,6 and 8
- Barrett, A.J., Kirschke, H., 1981. *Cathepsin B, cathepsin H, and cathepsin L. Methods Enzymol.* Hal 80, 535-561.
- Bellal. M. M., Nouani. F., Moulti- Mati., S. Belbraouet., 2011. Purification and characterization of a milk-clotting protease from *Mucor pusillus*: Method comparison. *African Journal of Biotechnology* Vol. 10(9). Hal 1655-1665
- Beltagy, A. L; T.A El Adawy; E. H. Rachman dan A.A El-Badawey. 2003. Purification and Characterization of an Acidic Protease from the Viscera of Bolti Fish (*Tilapia Nilotica*). *Food Science and Technology Departement*. Egypt. Hal 343-356
- Campbell, W. H., 1999. *Dialysis of Protein*, (<http://www.bio.edu/champbell/b1482/lectures.htm>). diakses pada hari Jumat tanggal 25 maret 2011, pukul 19.30 WIB.
- Caprette. D. R., 1995. *Biuret Protein Assay*, (<http://www.ruf.rice.edu/methods/protein/biuret.htm>). diakses pada hari Jumat tanggal 25 maret 2011, pukul 19.30 WIB.
- Chi , Z., Zhang, T., Liu, G., Li, J., Wang, X. 2009. Production, characterization and gene cloning of the extracellular enzymes from the marine-derived yeasts and their potential applications. *Biotechnology Advances* 27 (2009). Hal 236-255
- Chi, Z., Ni. X., Yue, L., J.Li., C.Wang, and C.Madzak. 2008. Alkaline Protease Gene Cloning from The Marine Yeast *Aurobasidium Pululans* HN2-3 and The Proteases Surface Display on *Yarrowia lipolitica* for bioactive peptide productions. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics* Vol 46, August 2009. Hal 294 – 298.

- Chi, Z., Ma. C., Xiumei. Ni., Liyan, Ma., Lingmei, Gao., 2007. Purification and Characterization of an Alkaline Proteases from Marine Yeast *Aureobasidium pullulans* for Bioactive Peptide Production from Different Sources. *UNESCO Chinese Center of Marine Biotechnology*. Ocean University of China. Yushan Road, no.5, Qingdao, China. Published online. Hal 343-351
- Chi, Z., C. Ma, P., H.F. Li. 2006. Optimization of medium and cultivation condition for alkaline proteases production by the marine yeast *Aureobasidium pullulans*. *Bioresource Technology* Vol. 98. Hal 534-538
- Cooper, T.G., 1977. *The Tool of Biochemistry*. John Willey and Sons. New York. Hal 391-404
- Davidson .V. L., and D. B. Sittman,. 1999. *Biochemistry*. Lipincott Williams and Wilkins. Maryland. Hal 27-34
- Davidek, J., J. Valisek dan J. Pokorny. 1990. *Chemical Changes During Food Processing*. Departemen of Food Chemistry and Analysis. Institut Chemical Technology, New York. Hal 55-67
- DeAngelis. K. M. 2007. *Phosphate Buffer*. (<http://www.Phosphatebuffer/deangelis/buffer.htm>). diakses pada hari Jumat tanggal 25 maret 2011, pukul 19.30 WIB.
- de la Fuente, M. A., Y. Hemar dan H. Singh. 2004. Influence of κ -carrageenan on the aggregation behaviour of proteins in heated whey protein isolate solutions. *J. Food Chemistry*. 86: hal 1-9.
- Duetscher, P.M., 1990. *Methods in Enzimology*. Academic Press Inc. New York, hal 285-289
- Ekananda, R. 2007. *Pembuatan dan Karakterisasi Biosensor Kolesterol dan Biosensor Glukosa*. Pusat Penelitian Elektronika dan Telekomunikasi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia. Hal 73-76
- Fardiaz, S., 1992. *Mikrobiologi Pangan 1*. Penerbit PT Gramedia Utama. Jakarta. Hal 43-56
- Gesualdo AML, Li-Chan ECY. 1999. Functional properties of fish protein hydrolysis from herring (*Clupea harengus*). *Journal of Food Science*. 64 (6): hal 1000-1004.
- Gopakumar, K., 1998. *Utilization of Bycatch and Low-Value Fish in India. Proceeding of TheApfic Symposium ; Fish Utilization in Asia and The Pacific*. Oxford and IBH. New Delhi. Hal 17-23
- Gupta R, Beg Q.K. 2002. *Bacterial Alkaline Proteases; Molecular Approaches and Industrial Applications*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Hal 57-63

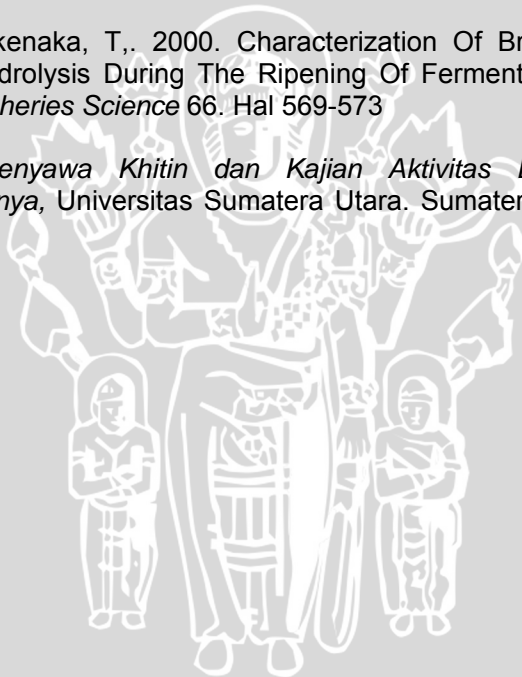
- Hadiwiyoto. 1993. *Teknologi Pengolahan Hasil Perikanan*. Jilid 1. Penerbit Liberty. Yogyakarta. Hal 23-31
- Hoyle, N. T., dan J. H. Merrit. 1994. Quality of Protein Hydrolysate from Herring (*Clupea harengus*). *Journal Food science*. Volume 59. No 1. Hal 76-79
- Irwadi. T. T. 2000. Kajian Sifat Enzim Xilanase Murni Dari *Neurophora sitophila*. PAU-Sioteknologi IPS. *Buletin Kimia (2000)* 1. Hal 17-22
- Jay, J. M. 1992. *Modern Food Microbiology. Fourth Edition*. Chapman & Hall. New York. Hal 7-12
- Janson, J.C., dan L. Ryden,. 1998. *Protein Purification Principles, High Resolution Methods and Aplications 2nd Edition*. John Willey and Sons Inc. New York. Hal 10-31
- Johnson AH, Peterson MS. 1974. *Encyclopedia of Food Technology*. Wesport Connecticut : The AVI Publ. Co. Inc. Vol. II.
- Judoamidjojo, R. M., A. A. Darwis, dan E.G. Sa'id. 1992. *Teknologi Fermentasi*. Rajawali Press. Jakarta. Hal 10-13
- Karlson., P. 1975. *Introduction to Modern Biochemistry.*, New York., Academic Press. Hal 23
- Kreger-Van Rij. 1984. The Yeast a Taonomic Study. *Third Revised dan Enlarged Edition*. Elsevier Science Publisher BV. Amsterdam. Hal 1082.
- Kristinsson, H. G., and Rasco, B., A., 2000. Fish Protein Hydrolysate; Production, Biochemical, and Fungtonal. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Hal 234-253
- Kutty S.N., and Philip. R., 2008. *Marine Yeast-a review*. Yeast 25: hal 465-483
- Lahl,W.J. and Braun, D.B. 1994. Enzymatic Production of Protein Hydrolisate for Food use. *Food Technology* :p. Hal 69-71
- Lehninger, A. L., 1995. *Dasar-Dasar Biokimia*. jilid 1. Alih bahasa; Thenawidjaja, M., Penerbit Erlangga. Jakarta. Hal 67-102
- Lowry O.H., Rosebrough N.J, Farr A.L, Randall R.J., 1951. Protein Measurement With The Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry*. Hal 137-149
- Ma, C. L., Chi, Z., Ma. C., Xiumei. Ni., Lingmei, Gao., 2007. Purification and Characterization of an Alkaline Proteases from Marine Yeast *Aureobasidium pullulans* for Bioactive Peptide Production from Different Sources. UNESCO Chinese Center of Marine Biotechnology. Ocean University of China. Yushan Road, no.5, Qingdao, China. *Published online*. Hal 343-351

- Marzuki. 1986. *Metodologi Riset. Fakultas Ekonomi. Universitas Islam Indonesia*. Yogyakarta. Hal 27-29
- Martin, Jr. D. W., P. A. Mayes and V. W. Rodwell. 1983. *Review of Biochemistry*. Alih bahasa: Adji Dharma dan A.S. Kurniawan. CV. EGC. Jakarta. Hal 87-89
- Martoharsono. 1987. *Biokimia*. Gajah Mada University Press. Yogyakarta. Hal 45-73
- Mathews, C.K dan Van Holde, K.E. 1990. *Biochemistry*. Benjamin Cummings Publishing Company Inc. USA. Hal 12-13
- Mathews, C.K. Van Holde, K.E., dan Kevin G.A., 2000. *Biochemistry, Third Edition*,. Addison Wesley Publishing Company. San Fransisco. Hal 57
- Meryandini, A., Widosari, W., Maranatha, B., Sunarti, T., Rachmania, dan satria. 2011. *Isolasi Bakteri Selulolitik Dan Karakterisasi Enzimnya*. Pusat Penelitian Sumberdaya Hayati dan Bioteknologi, IPB, Bogor. Hal 3-5
- McKee, T and R.M. James,. 2003. *Biochemistry : The Molecular Basic of Life*. Mc Graw Hill. Phidelphia. Hal 183. 47-53
- Naiola dan Widhyastuti. 2007. *Semipurifikasi dan Karakterisasi Protease dari beberapa Bakteri hayati* 13; hal 51-56
- Othmer, K., 1987. *Encyclopedia of Chemical Technology*. John Wiley and Sons Inc. New York. Hal 180-216
- Owusu-appenten. 2002. *Protein Analysis; Quantitative effection Processing*. Marcel Dekker Inc. New York. Hal 47-53
- Petersen, B. R. 1981. *The Impact of The Enzymatic Hydrolysis Process on Recovery and Use of Protein*. Dalam : Birch, G.G., Blakerbrough, N. and Parcker, K.J editor. *Enzymes and Food Processing*. Aplied Science Publihers Ltd. London. Hal 67-69
- Pierce M M, Raman C S and Nall B T 1999 *Methods*. Hal 213–21
- Pigott, G. M. and B.W. Tucker. 1990. *Seafood : Effectof Technology Hidrolysis* Marchel Dekker, Inc. New York. Hal 17-23
- Ping, W., C. Zhenming., dan M.A. Chunling. 2006. *Alkaline Protease Production by a strain of Marine Yeast*. *Journal of Ocean University of China*. Volume 5, no 3. Hal 263-268
- Poedjiadi, 1994. *Dasar-dasar Biokimia*. UI Press. Jakarta. Hal 37-45
- Rahayu, K., 1990. *Isolasi dan Pengujian Aktivitas Enzim*. PAU Pangan dan Gizi. Penerbit UGM Press. Yogyakarta. Hal 79-89

- Rao M.B, Tanksale A.M, Mohini S.G, and Deshpande V.V., 1998. *Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases*. *Microbiology and Molekular Biology Reviews*. Hal 600-604
- Red, G and T.W. Nagodawithana. 1987. *Yeast Technology. Second edition*. Van Nonstrand reinhold. New York. Hal 13-19
- Riyanto, I. 2006. *Analisis Kadar, Daya Cerna Dan Karakteristik Protein Daging Ayam Kampung Dan Hasil Olahannya*. Skripsi. Departemen Ilmu Produksi dan Teknologi Peternakan, Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor. Hal 63-66
- Roosdiana, A, dkk. 2003. Isolasi dan Karakterisasi Bacillus sp Penghasil Protease dari Kulit Ikan Kakap Merah (*Lutjanus sanguineus*). *Jurnal Ilmu-Ilmu Hayati (life Science)* volume 15 No 2. Hal 34-45
- Saraswati, A. 2011. *Skor asam amino*. (<http://www.bio.edu/asam-amino/b1482/lectures.htm>), diakses pada hari Kamis tanggal 19 Mei 2011, pukul 19.55 WIB.
- Sathivel S., Smiley S., Prinyawiwatkul W., and Peter. 2005. Functional and Nutritional Properties of Red Salmon (*Oncorhynchus nerka*) Enzymatic Hydrolysates. *Journal of Food Science C401*.Vol.70, Nr.6, 2005. Hal 157-185
- Schmidt. S., Richard .I., Harshi K., Bernard J., Carroll., Peer M., Schenk,. 2007. Plants can use protein as a nitrogen source without assistance from other organisms. _ PNAS _ March 18, 2008 _ vol. 105 _ no. 11. 4524–4529
- Scrim-Shaw, SN,. 1978. *Protein in Encyclopedia of Food Science*. A. H. Johnson Eds. Aulpbl. Co. inc. New York. Hal 32-37
- Shahidi, F dan Kamil, Y.V.A., J,. 2001. Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry. *Trends in Food Science & Technology* 12 (2001). Hal 435–464
- Shimuta. 2000. Expreition And Secretion Of Schitalydopepsin b, And Acid Protease From Scytalidium Lignilocum, In yeast. *Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry*. Vol 57. Hal 245-263
- Siegel IH. 1975. *Enzyme Kinetics Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium Steady State Enzyme Sistems*. New York: John Willey and Sons. Hal 19-29
- Sindumarta, M. 1999. *Biokimia I : Struktur dan Katalisis : catatan Kuliah*. Jurusan Kimia. Fakultas Matematika dan Ilmu pengetahuan Alam. ITB. Bandung.
- Smith, J.C.,. 1993. *Prinsip Bioteknologi*. Alih bahasa : A Dharma, PT Gramedia Pustaka Utama. Jakarta. Hal 66, 130-138

- Suhartono. 1989. *Enzim dan Bioteknologi*. PAU Bioteknologi. IPB. Bogor. 147-150
- Sumardi dan Dewi Lengkana. 2009. Isolasi Bacillus Penghasil Protease Dari Saluran Pencernaan Ayam Kampung. *Seminar Hasil Penelitian & Pengabdian Kepada Masyarakat*, Unila, hal 43-49
- Susi, W.,. 2002. *Isolasi Kitinase dari Scleroderma Columnare and Trichoderma harzianum*. Hal 24-226
- Sofro, A. S. M. 1990. *Biokimia*. Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. Hal 7-13
- Sorensen, H., S, Sorensen, C. Bjerregaard, and S, Michelson. 1999. *Chromatography and Capillary Electrophoresis in Food Analysis*. The Royal Society of Chemistry. Cambridge
- Souissi N., A. Bougatef, Y. Triki-Ellouz and M. Nasri. 2006. Biochemical and Functional Properties of Sardinella (Sardinella aurita) by –Product Hydrolysates. *Journal Food Technology Biotechnol*. Volume 45, No 2. Hal 187-194
- Stenken. J.A.,. 2011. *Microdialysis Sampling*. In Press: Wiley Encyclopedia of Medical Devices. Department of Chemistry & Chemical Biology Rensselaer Polytechnic Institute. Hal 3
- Tansel, B., Bao. W.Y. and Tansel I.N., 2000, *Characterization of fouling kinetics in ultrafiltration systems by resistances in series model*. *Desalination*. 129: hal 7-14.
- Thenawidaja, M. 1984. *Pengantar Kinetika Enzim*. Fateta IPB. Bogor. Hal 15-16
- Thiansulakul Y., Sootfawat B., Fereidoon S.,. 2006. Composition, Functional Properties and Antioxidative activity of Protein Hydrolysates Prepared from Round Scad (*Decapterus maruadsi*). Elsevier Inc. *Food Chemistry* 103 (2007). Hal 1385-1394
- Trenggono dan Setaji. 2008. *Petunjuk Laboratorium Biokimia Pangan*. PAU Pangan dan Gizi UGM, Yogyakarta. Hal 7-13
- Tortora GJ, Funke BR, Case CL. 1989. *Microbiology and Introduction*. Ed ke-3. California: The Benjamin/Cumming Publisher Company, Inc.
- Utomo, 1997. *Rangkuman Metode Isolasi Enzim Skala Laboratorium*, Universitas Brawijaya, Malang. Hal 12-14
- Voet, D. dan Voet, J.,. 1990. *Biochemistry*. John Wiley and Sons Inc., New York. Hal 432,509
- Walker, G.M. 1998. *Yeast Physiology and Biotechnology*. John Willey and Sons, Inc. United State of Amerika. Hal 7-11
- West, E.S.,. 1996. *Textbook of Biochemistry*. 4thed. The Maximillan Company. London. Hal 324-327, 334-336

- Whitaker JR. 1994. *Principle of Enzymology for The Food Science. Second Edition*. New York :Marcel Decker. Hal 47-53
- Wikipedia. 2011. *Buffer Solution*. (http://www.Wikipedia.org/wiki/buffer_solution) diakses pada hari Jumat tanggal 25 maret 2011, pukul 19.30 WIB.
- Wikipedia. 2011. *Metionin*. (<http://www.Wikipedia.org/wiki/metionin>) diakses pada hari Jumat tanggal 25 maret 2011, pukul 19.30 WIB.
- Winarno, F.G. 1995. *Enzim Pangan*. PT Gramedia Pustaka Utama. Jakarta. Hlm 115
- Wiyanto, 2003. *Bioprospecting Khamir Laut Melalui Pendekatan Fisiologis dan Isolasi DNA Total*. Thesis. Program Pasca Sarjana. Universitas Brawijaya Malang. Tidak dipublikasikan. Hal 19-27
- Yatsumi, K. and Takenaka, T,. 2000. Characterization Of Brine Proteasr As Agents Of Hydrolysis During The Ripening Of Fermented Sardine With Rice-Bran. *Fisheries Science* 66. Hal 569-573
- Yurnaliza. 2002. *Senyawa Khitin dan Kajian Aktivitas Enzim Mikrobial Pendegradasinya*, Universitas Sumatera Utara. Sumatera Utara. Hal 59-63



Lampiran 1. Penghitungan Konsentrasi Protein Enzim Dialisat Khamir Laut Dengan Spektrofometer

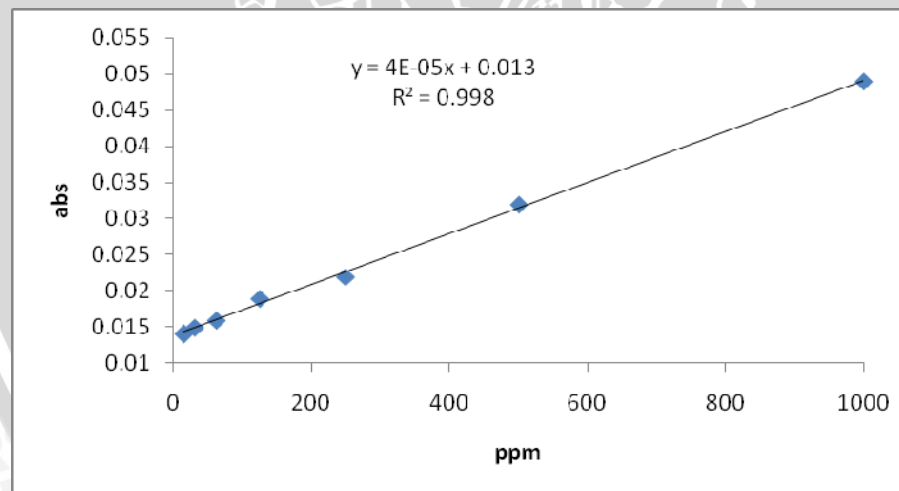
Hasil Spektrofotometri pada sampel dialisat khamir laut yaitu:

	Abs	k x abs
Protease	0,040	0,0399

Hasil Spektrofotometri standar protein BSA pada berbagai konsentrasi yaitu:

konsentrasi	Abs	k x abs
15,625	0,014	0,0143
31,25	0,015	0,0149
62,5	0,016	0,0160
125	0,019	0,0186
250	0,022	0,0222
500	0,032	0,0319
1000	0,049	0,0490

Selanjutnya standar BSA tersebut dibuat kurva linier grafik standar BSA dengan *Microsoft excel 2007*. Konsentrasi (ppm) sebagai sumbu X dan absorbansi sebagai sumbu Y. Grafik standar BSA dapat dilihat pada gambar 6.



Dari grafik standar tersebut didapatkan persamaan $y = 0,00004x + 0,0138$, $R^2 = 0,9985$

Untuk mengetahui konsentrasi protease dialisat khamir laut, hasil absorbansi pada ekstrak khamir laut tersebut kemudian dimasukkan dalam

persamaan regresi linier grafik standar BSA tersebut sebagai sumbu x, sehingga dapat diketahui nilai konsentrasi protein dialisat khamir laut yaitu :

$$y = 0,00004x + 0,0138$$

$$0,040 = 0,00004x + 0,0138$$

$$0,040 - 0,0138 = 0,00004x$$

$$X = 655 \text{ ppm}$$

Atau setara dengan 655 mg/L. Karena dilakukan pengenceran 100x pada protease sehingga dapat diketahui bahwa dalam 1 mL dialisat khamir laut memiliki konsentrasi protein sebesar 65,5 mg.



Lampiran 2. Penghitungan Aktivitas Protease Ekstrak Khamir Laut Dengan Spektrofotometer

Perhitungan aktivitas enzim yaitu ;

$$U = \frac{\text{abs. sampel} - \text{abs. blanko}}{\text{abs. standar} - \text{abs. blanko}} \times \text{fp} \times \frac{1}{t \text{ inkubasi}}$$

Hasil pembacaan spektrofotometer pada masing-masing perlakuan yaitu ;

$$\text{Absorbansi sampel} = 0,023$$

$$\text{Absorbansi standar} = 0,023$$

$$\text{Absorbansi blanko} = 0,020$$

Waktu inkubasi yang digunakan yaitu selama 20 menit.

Sehingga dapat dihitung :

$$U = \frac{0,023 - 0,020}{0,023 - 0,020} \times 1 \times \frac{1}{20}$$

$$U = 0,05 \text{ U/menit}$$

Karena protease yang digunakan saat pengujian sebesar 1 mL, jadi dapat dihitung aktivitas enzim khamir laut per mL yaitu sebesar ;

$$U = 0,05 \text{ U/menit}$$

$$U = 0,05 \text{ U/menit/mL}$$

$$U = 50 \text{ mU/menit/mL}$$

Aktivitas spesifik enzim yaitu aktivitas enzim dalam mg konsentrasi protein enzim (U/mg) sehingga dapat dihitung yaitu ;

$$U = \frac{50 \text{ mU/menit/mL}}{65,5 \text{ mg}}$$

$$U = 0,763 \text{ mU/mg}$$

Lampiran 3. Perhitungan Kecepatan Maksimum (V_{maks}) Dan Konstanta Michaelis – Menten (K_M)

Perhitungan Kecepatan Reaksi (V)

Hasil uji spektrofotometri konsentrasi enzim : substrat yaitu :

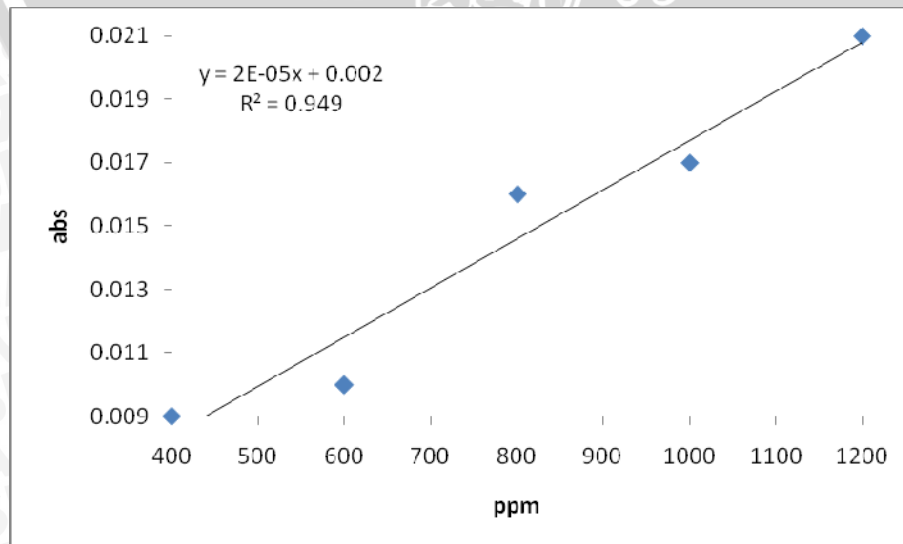
Enzim : substrat	Absorbansi
1 ml : 2 ml	1,744
1 ml : 4 ml	1,414
1 ml : 6 ml	1,106
1 ml : 8 ml	1,178
1 ml : 10 ml	0,708

Untuk mendapatkan nilai kecepatan reaksi (v) terlebih dulu dihitung konsentrasi masing-masing hidrolisat berdasarkan persamaan regresi linier kurva standar tirosin dengan reagen folin – phenol ciocalteau :

Standart tyrosin yang digunakan yaitu :

Konsentrasi	Absorbansi
400	0,009
600	0,010
800	0,016
1000	0,017
1200	0,021

Dari standart tirosin yang digunakan diatas kemudian dibuat regresi linier kurva standart tirosin, dimana konsentrasi sebagai sumbu x dan absorbansi sebagai sumbu y.



Dari grafik diatas didapatkan persamaan $y = 0,00002x + 0,002$.

Sehingga konsentrasi masing – masing hidrolisat (enzim : substrat) dapat dihitung dengan rumus tersebut (untuk mencari konsentrasi (x), hasil absorbansi dimasukkan dalam y) sebagai berikut :

Enzim : substrat	absorbansi	$X = (y - 0,002)/0,00002$	Konsentrasi (ppm)
1 ml : 2 ml	1,744	$(1,744 - 0,002)/0,00002$	87100
1 ml : 4 ml	1,414	$(1,414 - 0,002)/0,00002$	70600
1 ml : 6 ml	1,106	$(1,106 - 0,002)/0,00002$	55200
1 ml : 8 ml	1,178	$(1,178 - 0,002)/0,00002$	58800
1 ml : 10 ml	0,708	$(0,708 - 0,002)/0,00002$	35300

Kecepatan reaksi (V) masing – masing hidrolisis pada berbagai konsentrasi enzim : substrat dapat dihitung dengan rumus :

Enzim : substrat	Konsentrasi (ppm)	Mol (gr/mr*)	V (mol/menit**)	1/V
1 ml : 2 ml	87100	480,710856	0,024035542	41,60505167
1 ml : 4 ml	70600	389,6462277	0,019482311	51,32861189
1 ml : 6 ml	55200	304,6525746	0,015232628	65,64855073
1 ml : 8 ml	58800	324,5212208	0,016226061	61,6292517
1 ml : 10 ml	35300	194,8231139	0,009741155	102,6572238

* mr tirosin = 181,19

** waktu saat inkubasi 20 menit

Perhitungan Konsentrasi Substrat (S)

Hasil uji spektrofotometri dari konsentrasi enzim : substrat yaitu :

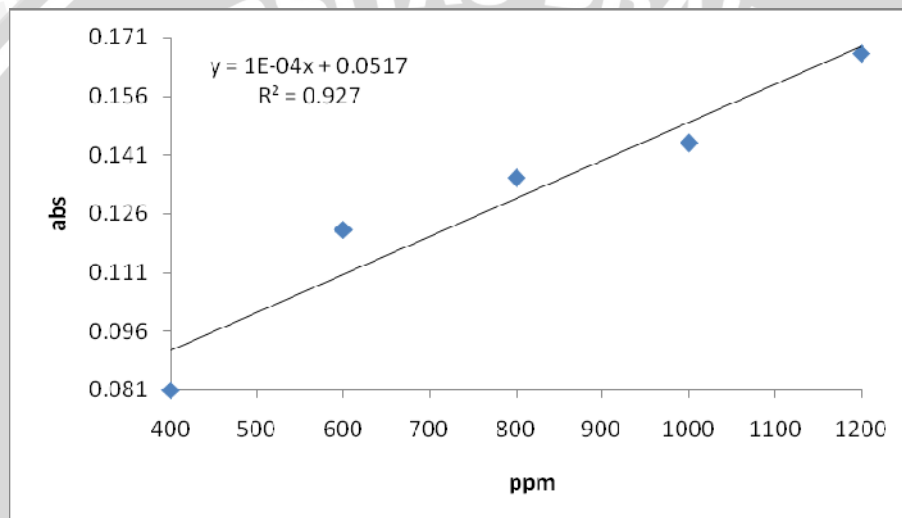
Enzim : substrat	Absorbansi
1 ml : 2 ml	1,041
1 ml : 4 ml	0,916
1 ml : 6 ml	0,746
1 ml : 8 ml	0,553
1 ml : 10 ml	0,438

Untuk mendapatkan nilai konsentrasi substrat dihitung terlebih dulu konsentrasi masing – masing hidrolisat berdasarkan persamaan regresi linier kurva standart BSA dengan reagen biuret yaitu :

Standart BSA yang digunakan yaitu :

Konsentrasi	Absorbansi
400	0,081
600	0,122
800	0,135
1000	0,144
1200	0,167

Dari standart BSA yang digunakan diatas kemudian dibuat regresi linier kurva standart BSA, dimana konsentrasi sebagai sumbu x dan absorbansi sebagai sumbu y.



Dari grafik diatas didapatkan persamaan $y = 0,0001x + 0,0517$.

Sehingga masing – masing hidrolisat (enzim : substrat) dapat dihitung dengan rumus tersebut (untuk mencari konsentrasi (x), hasil absorbansi dimasukkan dalam y) sebagai berikut :

Enzim : substrat	absorbansi	$X = (y - 0,0517)/0,0001$	Konsentrasi (ppm)
1 ml : 2 ml	1,041	$(1,041 - 0,0517)/0,0001$	9893
1 ml : 4 ml	0,916	$(0,916 - 0,0517)/0,0001$	8643
1 ml : 6 ml	0,746	$(0,746 - 0,0517)/0,0001$	6943
1 ml : 8 ml	0,553	$(0,553 - 0,0517)/0,0001$	5013
1 ml : 10 ml	0,438	$(0,438 - 0,0517)/0,0001$	3863

Konsentrasi substrat [S] masing – masing hidrolisis pada berbagai konsentrasi enzim : substrat dapat dihitung dengan rumus :

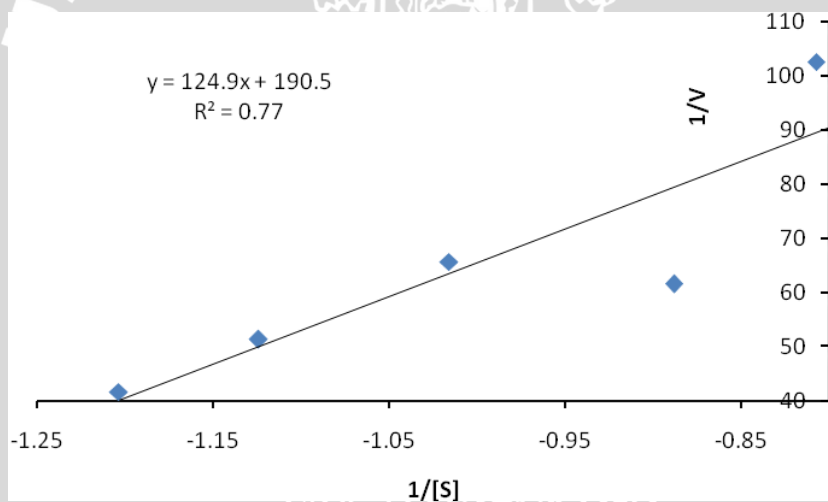
$[S] = \text{mol}$

Enzim : substrat	Konsentrasi (ppm)	[S] (mol)	Log [S]	1/[S]
1 ml : 2 ml	9893	0,147656716	-0,830746793	-1,203736214
1 ml : 4 ml	8643	0,129	-0,889410289	-1,124340489
1 ml : 6 ml	6943	0,103626865	-0,984527637	-1,015715519
1 ml : 8 ml	5013	0,074820895	-1,125977098	-0,88811753
1 ml : 10 ml	3863	0,057656716	-1,239150095	-0,80700474

Mr BSA = 67000

Pembuatan Kurva Lineweaver - Burk

Dibuat grafik kurva lineweaver – burk yang menyatakan hubungan antara perubahan konsentrasi $1/[s]$ dengan kecepatan reaksi $1/v$, dengan $1/[s]$ sebagai sumbu x dan $1/v$ sebagai sumbu y untuk mendapatkan nilai kecepatan maksimum (V_{maks}) dan konstanta Michaelis – Menten (K_M). kurva lineweaver – burk dibuat dengan menggunakan Microsoft exel 2007.



Perhitungan V_{maks} ($\text{mol} \times \text{liter}^{-1} \times \text{min}^{-1}$)

Untuk mengetahui kecepatan reaksi maksimum dialisis protease khamir laut dalam menghidrolisis protein ikan peperek dapat diketahui dari persamaan kurva linier diatas $y = 124,9x + 190,5$ dimana untuk mendapatkan kecepatan reaksi maksimum (y), x harus dijadikan nol. Perhitungannya sebagai berikut :

$$y = 124,9x + 190,5$$

$$1/V_{maks} = 124,9x + 190,5$$

$$1/V_{maks} = 124,9 \times 0 + 190,5$$

$$1/V_{\text{maks}} = 190,5$$

$$V_{\text{maks}} = 1/190,5$$

$$V_{\text{maks}} = 0,005249343 \text{ mol} \times \text{liter}^{-1} \times \text{min}^{-1}$$

Atau untuk mendapatkan kecepatan maksimum tiap mg protein dialisat khamir laut, dapat dihitung sebagai berikut :

$0,005249343 \text{ mol} \times \text{liter}^{-1} \times \text{min}^{-1} / 65,5 \text{ mg}$ (konsentrasi protein dialisat khamir laut)

$$V_{\text{maks}} = 0,080142653 \text{ mmol} \times \text{liter}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$$

Perhitungan K_M (M)

Untuk mengetahui afinitas enzim substrat (ES) dapat diketahui dari persamaan kurva lineweaver – burk yaitu $y = 0,125x + 0,190$, dimana untuk mendapatkan nilai K_m (x), y harus dijadikan nol. Perhitungannya sebagai berikut :

$$y = 124,9x + 190,5$$

$$Y = 124,9x (-1/K_m) + 190,5$$

$$0 = 124,9x (-1/K_m) + 190,5$$

$$-1/K_m = -190,5/124,9$$

$$1/K_m = 1,53$$

$$K_m = 1/1,53$$

$$K_m = 0,653594771 \text{ M}$$

Lampiran 4. Perhitungan Derajat Hidrolisis

Derajat hidrolisis dihitung dengan rumus ;

$$DH \% = \frac{(10 \% \text{ TCA} - \text{nitrogen terlarut dalam sampel})}{\text{Total N dalam sampel}} \times 100$$

➤ Pengaruh Waktu

Hasil uji Nitrogen total dan Nitrogen terlarut terhadap sampel hidrolisat protein ikan peperek dengan spektrofotometer yaitu :

Perhitungan N Total

Waktu (menit) ke	absorbansi	$\left(\frac{\text{Abs}}{0,0586} \times 2500 \right) / 10000$
0	0,385	1,64249147
25	0,420	1,79180887
50	0,465	1,9837884
75	0,435	1,85580205
100	0,355	1,51450512

Perhitungan N terlarut dalam sampel

Waktu (menit) ke	absorbansi	$\left(\frac{\text{Abs}}{0,0586} \times 2500 \right) / 10000$
0	0,185	0,78924915
25	0,230	0,98122867
50	0,255	1,087883959
75	0,240	1,0239078
100	0,200	0,85324233

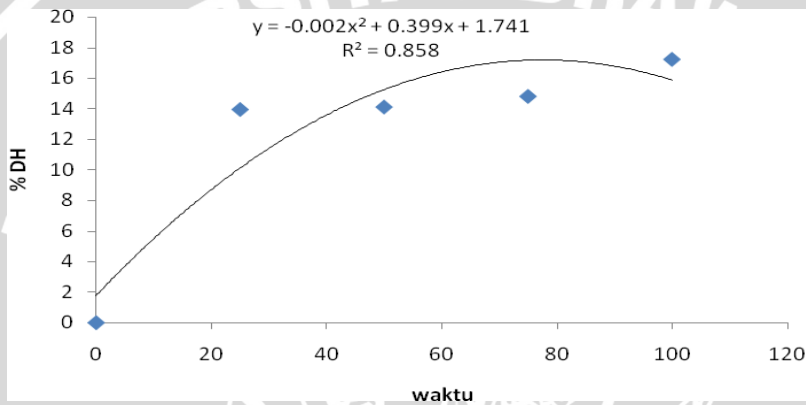
Dari nilai rerata N total dan N terlarut tersebut kemudian dimasukkan dalam rumus Derajat Hidrolisat yaitu :

Menit ke	N Total	N terlarut	$DH\% = \frac{(10 \% \text{ TCA} - \text{N terlarut})}{\text{N Total}} \times 100$
0	1,64249147	0,78924915	48,0519
25	1,79180887	0,98122867	54,7619
50	1,9837884	1,087883959	54,83870956
75	1,85580205	1,0239078	55,1725
100	1,51450512	0,85324233	56,338

Diasumsikan bahwa saat perlakuan waktu selama Nol menit belum ada nitrogen yang dibebaskan, sehingga nilai DH diatas dikonversikan menjadi :

Waktu (menit) ke	DH	$\left(\frac{\text{DH perlakuan waktu} - \text{DH nol menit}}{\text{DH nol menit}} \right) \times 100$	%DH
0	48,0519	$(48,0519 - 48,0519) / 48,0519 \times 100$	0
25	54,7619	$(54,7619 - 48,0519) / 48,0519 \times 100$	13,9640
50	54,83870956	$(54,83870956 - 48,0519) / 48,0519 \times 100$	14,1239151
75	55,1725	$(55,1725 - 48,0519) / 48,0519 \times 100$	14,81856076
100	56,338	$(56,338 - 48,0519) / 48,0519 \times 100$	17,24406319

Dari hasil diatas kemudian dibuat kurva hubungan antara waktu hidrolisis dan nilai DH masing – masing hidrolisat. Waktu sebagai sumbu X dan nilai DH sebagai sumbu Y:



Dari kurva tersebut didapatkan persamaan :

$$Y = -0,002x^2 + 0,399x + 1,741$$

Kemudian diturunkan menjadi

$$Y = -0,004x + 0,399$$

Untuk mendapatkan waktu maksimal proses hidrolisis, sumbu y dari persamaan tersebut dibuat menjadi nol, sehingga dapat dihitung ;

$$Y = -0,004x + 0,399$$

$$0 = -0,004x + 0,399$$

$$X = 99,75$$

➤ Pengaruh pH

Hasil uji Nitrogen total dan Nitrogen terlarut terhadap sampel hidrolisat protein ikan peperek dengan spektrofotometer yaitu :

Perhitungan N Total

pH perlakuan	absorbansi	$\left(\frac{\text{Abs}}{0,0586} \times 2500 \right) / 10000$
2	0,425	1,813139932
3	0,435	1,855802048
4	0,470	2,00511945
5	0,485	2,069112628
6	0,500	2,13310580

Perhitungan N terlarut dalam sampel

pH perlakuan	absorbansi	$\left(\frac{\text{Abs}}{0,0586} \times 2500 \right) / 10000$
2	0,183	0,780716723
3	0,215	0,917235494
4	0,240	1,023890785
5	0,270	1,151877133
6	0,280	1,19453925

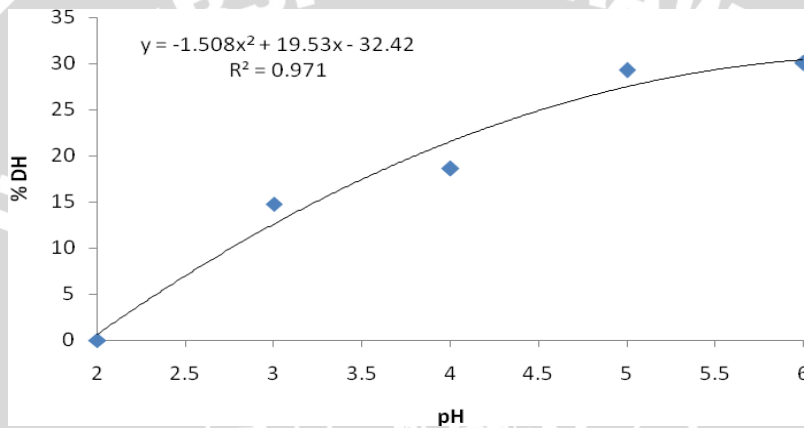
Dari nilai rerata N total dan N terlarut tersebut kemudian dimasukkan dalam rumus Derajat Hidrolisat yaitu :

pH perlakuan	N Total	N terlarut	DH% = $\frac{(10\% \text{ TCA} - \text{N terlarut})}{\text{N Total}} \times 100$
2	1,813139932	0,780716723	43,06
3	1,855802048	0,917235494	49,4252873
4	2,00511945	1,023890785	51,06
5	2,069112628	1,151877133	55,67010309
6	2,13310580	1,19453925	56

Diasumsikan bahwa saat perlakuan pH selama Nol menit belum ada nitrogen yang dibebaskan, sehingga nilai DH diatas dikonversikan menjadi :

pH perlakuan	DH	$\left(\frac{\text{DH perlakuan waktu} - \text{DH nol menit}}{\text{DH nol menit}} \right) \times 100$	%DH
2	43,06	$(43,06-43,06)/ 43,06 \times 100$	0
3	49,4252873	$(49,4252873-43,06)/ 43,06 \times 100$	14,78236716
4	51,06	$(51,06-43,06)/ 43,06 \times 100$	18,57872736
5	55,67010309	$(55,67010309-43,06)/ 43,06 \times 100$	29,28495841
6	56	$(56-43,06)/ 43,06 \times 100$	30,0510915

Dari hasil diatas kemudian dibuat kurva hubungan antara pH hidrolisis dan nilai DH masing – masing hidrolisat. pH sebagai sumbu X dan nilai DH sebagai sumbu Y:



Dari kurva tersebut didapatkan persamaan :

$$Y = -1,508x^2 + 19,53x - 32,42$$

Kemudian diturunkan menjadi

$$Y = -3,016x + 19,53$$

Untuk mendapatkan pH maksimal proses hidrolisis, sumbu y dari persamaan tersebut dibuat menjadi nol, sehingga dapat dihitung ;

$$Y = -3,016x + 19,53$$

$$X = 6,475$$

➤ Pengaruh suhu

Hasil uji Nitrogen total dan Nitrogen terlarut terhadap sampel hidrolisat protein ikan peperek dengan spektrofotometer yaitu :

Perhitungan N Total

Suhu perlakuan	Absorbansi	$\left(\frac{\text{Abs}}{0,0586} \times 2500 \right) / 10000$
34	0,445	1,898464164
37	0,470	2,005119454
40	0,495	2,111774711
43	0,525	2,239761092
46	0,515	2,197098976

Perhitungan Nitrogen terlarut dalam sampel

Suhu perlakuan	Absorbansi	$\left(\frac{\text{Abs}}{0,0586} \times 2500 \right) / 10000$
34	0,245	1,045221843
37	0,265	1,130546075
40	0,285	1,215870307
43	0,315	1,343856655
46	0,300	1,279863481

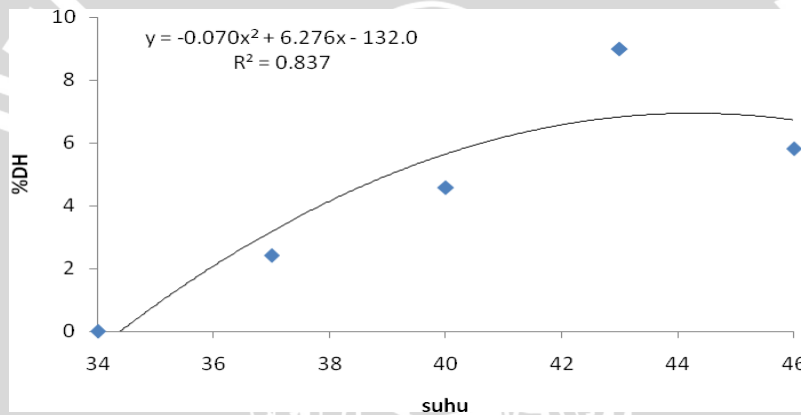
Dari nilai rerata N total dan N terlarut tersebut kemudian dimasukkan dalam rumus Derajat Hidrolisat yaitu :

Suhu perlakuan	N Total	N terlarut	$\text{DH}\% = \frac{(10\% \text{ TCA} - \text{N terlarut})}{\text{N Total}} \times 100$
34	1,898464164	1,045221843	55,05617977
37	2,005119454	1,130546075	56,38297872
40	2,111774711	1,215870307	57,57575757
43	2,239761092	1,343856655	60
46	2,197098976	1,279863481	58,25242717

Diasumsikan bahwa saat perlakuan suhu selama Nol menit belum ada nitrogen yang dibebaskan, sehingga nilai DH diatas dikonversikan menjadi :

Suhu perlakuan	DH	$\left(\frac{\text{DH perlakuan waktu} - \text{DH nol menit}}{\text{DH nol menit}} \right) \times 100$	%DH
34	55,05617977	$(55,05617977 - 55,05617977) / 55,05617977$	0
37	56,38297872	$(56,38297872 - 55,05617977) / 55,05617977$	2,409900137
40	57,57575757	$(57,57575757 - 55,05617977) / 55,05617977$	4,576374969
43	60	$(60 - 55,05617977) / 55,05617977$	8,979591854
46	58,25242717	$(58,25242717 - 55,05617977) / 55,05617977$	5,805428959

Dari hasil diatas kemudian dibuat kurva hubungan antara suhu hidrolisis dan nilai DH masing – masing hidrolisat. Suhu sebagai sumbu X dan nilai DH sebagai sumbu Y:



Dari kurva tersebut didapatkan persamaan :

$$Y = - 0,070x^2 + 6,276x - 132,0$$

Kemudian diturunkan menjadi

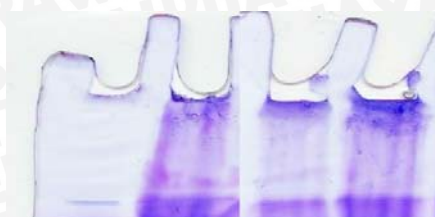
$$Y = - 0,14x + 6,276$$

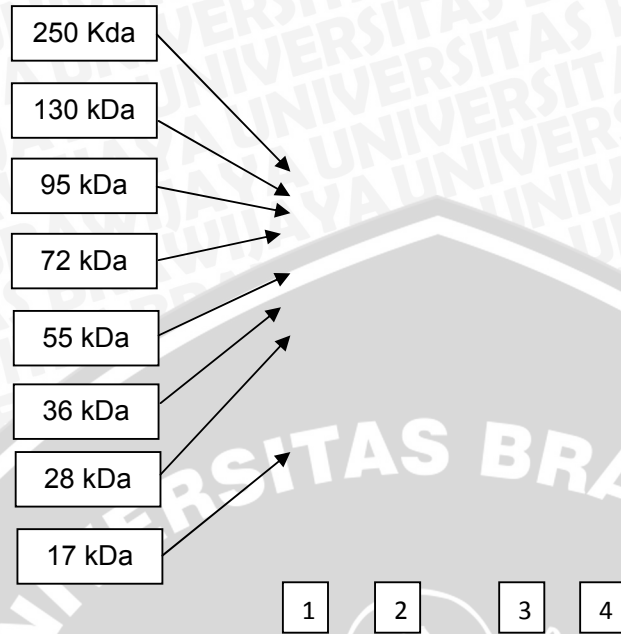
Untuk mendapatkan suhu maksimal proses hidrolisis, sumbu y dari persamaan tersebut dibuat menjadi nol, sehingga dapat dihitung ;

$$\begin{aligned} Y &= - 0,14x + 6,276 \\ &= 44,829 \end{aligned}$$

Lampiran 5. Perhitungan Berat Molekul (SDS PAGE)

Hasil SDS PAGE hidrolisat protein ikan peperek





Gambar 4. 1. Marker prestained protein ladder, 2. Ikan peperek, 3. Hidrolisat protein ikan dengan pengenceran, 4. Hidrolisat protein ikan tanpa pengenceran

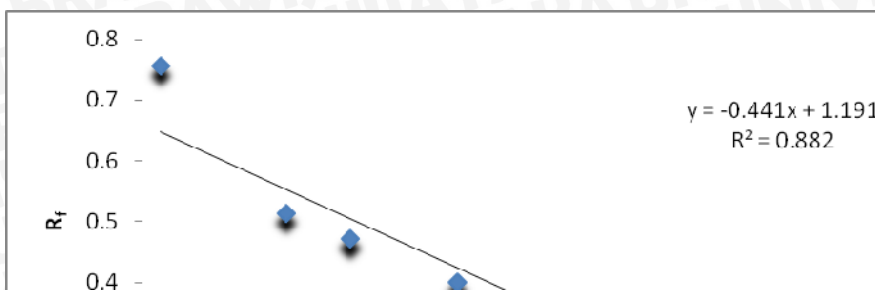
Diukur jarak tracking masing-masing pita protein hasil gel elektroforesis,

Jarak penuh tracking yaitu = 70

Marker prestained protein ladder

BM(kDa)	Jarak Tracking	Log BM	R _f (jarak tracking/ jarak penuh tracking)
250	15	2,39794001	0,214285714
130	18	2,11394335	0,257142857
95	20	1,97772361	0,285714286
72	22	1,8573325	0,314285714
55	28	1,74036269	0,4
36	33	1,5563025	0,471428571
28	36	1,44715803	0,514285714
17	53	1,23044892	0,757142857

Berdasarkan hasil diatas dibuat kurva sebagai berikut :



Dari kurva diatas diperoleh persamaan $y = -0,441x + 1,191$

Persamaan tersebut digunakan untuk mendapatkan nilai BM dari sampel hidrolisat protein ikan peperek dan sampel protein ikan peperek tanpa hidrolisis.

Dengan cara terlebih dahulu menghitung

$$R_f = (\text{jarak tracking} / \text{jarak penuh tracking})$$

$$\text{Log BM (x)} = y - 1,191 / -0,441$$

$$\text{BM} = 10^{\text{logBM}}$$

Berat molekul ikan peperek:

BM(kDa)	Jarak Tracking	Log BM	R _f
---------	----------------	--------	----------------

157,1036	15	2,19618617	0,214285714
125,6679	18	2,09922431	0,257142857
74,64143	25	1,87297996	0,357142857
59,70602	28	1,7760181	0,4
51,44899	30	1,71137686	0,428571429
41,15428	33	1,614415	0,471428571
32,91949	36	1,51745314	0,514285714
22,69081	41	1,35585003	0,585714286
15,64037	46	1,19424693	0,657142857
10,78062	51	1,03264383	0,728571429
7,430888	56	0,87104072	0,8
5,121977	61	0,70943762	0,871428571
3,530486	66	0,54783452	0,942857143

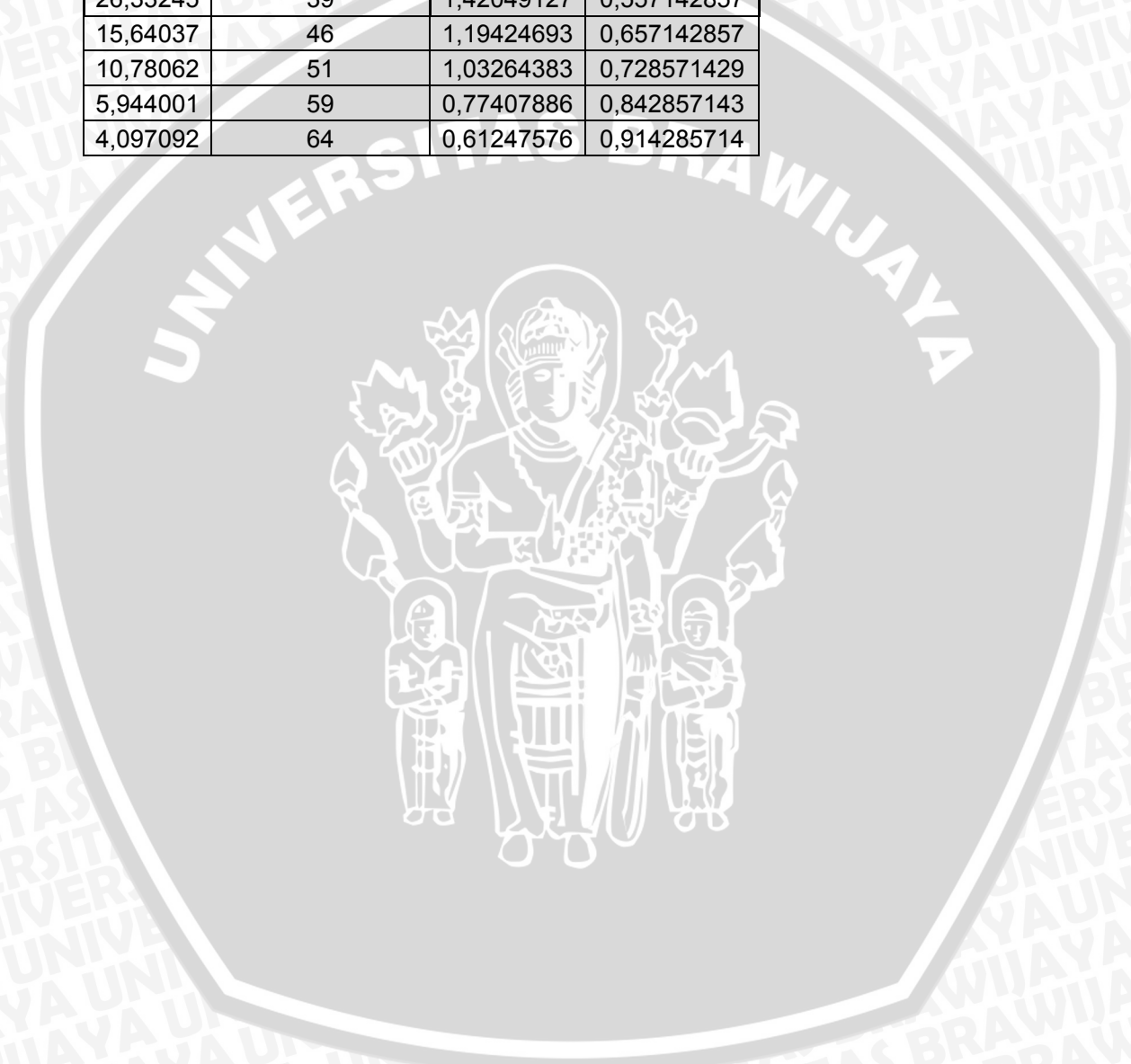
Berat Molekul hidrolisat ikan peperek dengan pengenceran :

BM(kDa)	Jarak Tracking	Log BM	R _f
157,1036	15	2,19618617	0,214285714
125,6679	18	2,09922431	0,257142857
93,31293	22	1,96994182	0,314285714
59,70602	28	1,7760181	0,4
51,44899	30	1,71137686	0,428571429
41,15428	33	1,614415	0,471428571
32,91949	36	1,51745314	0,514285714
26,33245	39	1,42049127	0,557142857
15,64037	46	1,19424693	0,657142857
10,78062	51	1,03264383	0,728571429
5,944001	59	0,77407886	0,842857143
4,097092	64	0,61247576	0,914285714

Berat molekul hidrolisat ikan peperek tanpa pengenceran :

BM(kDa)	Jarak Tracking	Log BM	R _f
157,1036	15	2,19618617	0,214285714

125,6679	18	2,09922431	0,257142857
93,31293	22	1,96994182	0,314285714
69,28821	26	1,84065934	0,371428571
59,70602	28	1,7760181	0,4
51,44899	30	1,71137686	0,428571429
41,15428	33	1,614415	0,471428571
32,91949	36	1,51745314	0,514285714
26,33245	39	1,42049127	0,557142857
15,64037	46	1,19424693	0,657142857
10,78062	51	1,03264383	0,728571429
5,944001	59	0,77407886	0,842857143
4,097092	64	0,61247576	0,914285714



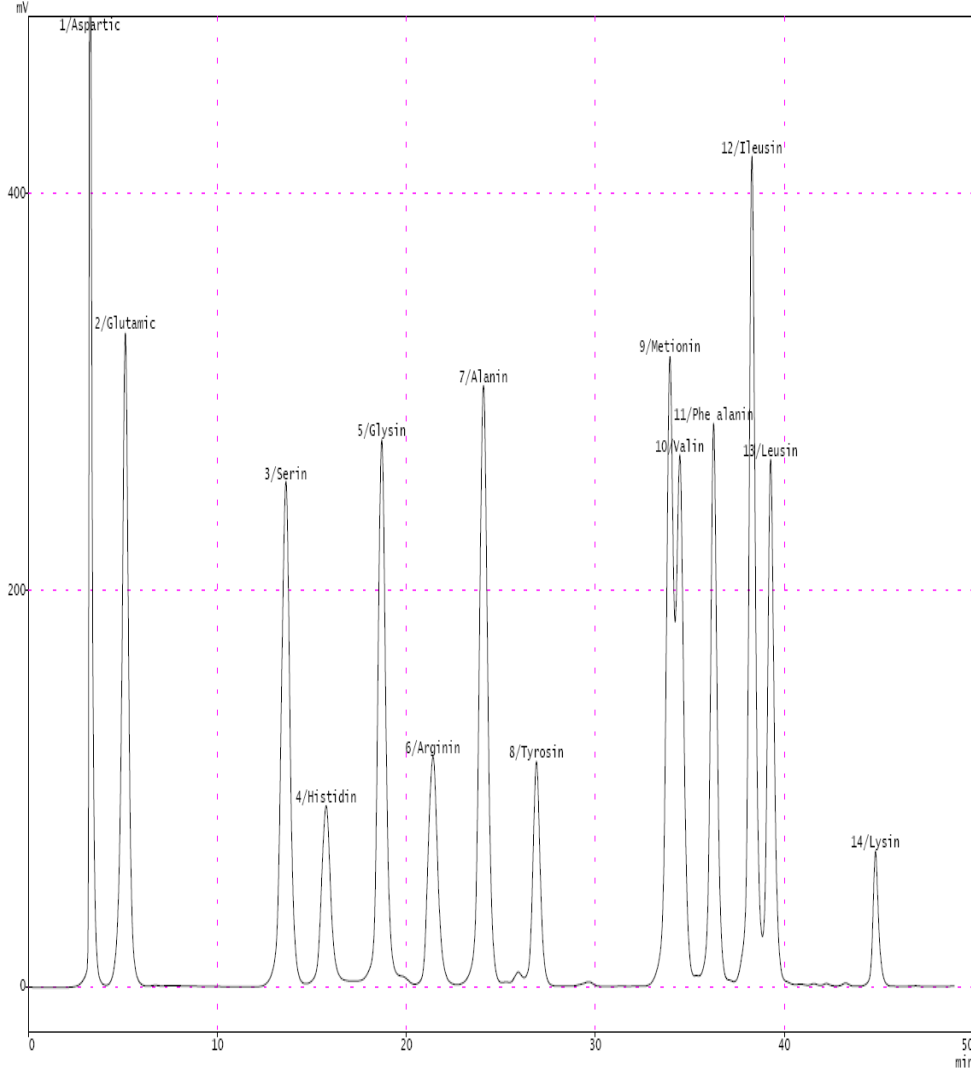
Lampiran 6. Perhitungan Asam Amino

Hasil kromatogram HPLC pada standar asam amino, yaitu;



CLASS-LC10 DATA=AA1750.D01 99/10/17 01:51:36
 Sample : Standart AA 14 1750ppm
 Method Filename: ANG.MET

*** Chromatogram ***



*** Peak Report ***

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	CONC	NAME
1	3.246	6726310	605394		Aspartic
2	5.111	8220281	328506		Glutamic
3	13.599	8317215	251859		Serin
4	15.737	3283669	89601		Histidin
5	18.680	8473217	272151		Glysin
6	21.390	4109914	113942		Arginin
7	24.064	9401683	296384		Alanin
8	26.866	2897836	107529		Tyrosin
9	33.931	9241849	310532		Metionin
10	34.451	6708633	264680		Valin
11	36.242	7112369	280384		Phe alanin
12	38.270	10277625	404749		Ileusin
13	39.260	6532151	258389		Leusin
14	44.810	1435243	65889		Lysin
		92737996	3649989		

Hasil kromatogram HPLC pada sampel ikan peperek yaitu;

CLASS-LC10 DATA=IKAN4.D01 99/12/16 21:36:08
 Sample : Sampel ikan
 Method Filename: ANG.MET

*** Chromatogram ***

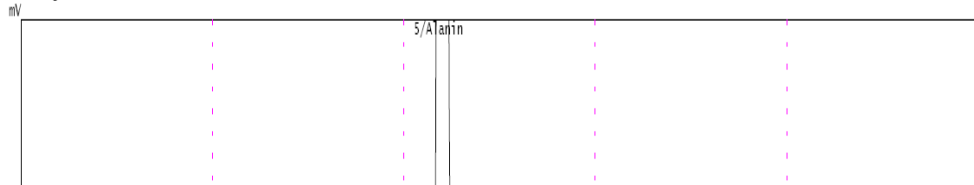




Hasil kromatogram HPLC pada sampel hidrolisat ikan peperek yang dihidrolisis dengan dialisat khamir laut, yaitu;

CLASS-LC10 DATA=B6.D01 99/12/04 23:06:38
Sample : Sampel B6
Method Filename: ANG.MET

*** Chromatogram ***





$$\text{Kadar asam amino} = \frac{\text{Luas area sampel}}{\text{Luas area standar}} \times [\text{standar}] \times \frac{\text{volum injeksi sampel}}{\text{volum injeksi standar}}$$

- Kadar asam amino sampel ikan peperek



Profil asam amino	Luas Area Sampel	Luas Area Standart	$\frac{\text{Luas area sampel}}{\text{Luas area standar}}$	HASIL
Aspartic	5701431	6726310	0,847631	1483,354804
Glutamic	8408353	8220281	1,022879	1790,038291
Serin	2368930	8317215	0,284823	498,4393815
Histidin	288854	3283669	0,087967	153,9419777
Glisin	2517706	8473217	0,297137	519,9896922
Arginin	1813099	4109914	0,441153	772,0169449
Alanin	4271873	9401683	0,454373	795,1531391
Tirosin	1110003	2897836	0,383045	670,3296011
Valin	3712979	6708633	0,553463	968,559951
Fenilalanin	1374373	7112369	0,193237	338,1647873
Isoleusin	1659051	10277625	0,161424	282,4912614
Leusin	4135897	6532151	0,63316	1108,030073
Lisin	565861	1435243	0,394261	689,9575542

- Kadar asam amino sampel hidrolisat ikan peperek

Profil asam amino	Luas area sampel	Luas Area Standart	$\frac{\text{Luas area sampel}}{\text{Luas area standar}}$	HASIL
Glutamic	13450605	8220281	1,636271	2863,473736
Histidin	2545816	3283669	0,775296	1356,768298
Glisin	14062986	8473217	1,659699	2904,472469
Alanin	82222208	9401683	8,745478	15304,58579
Tirosin	9179040	2897836	3,16755	5543,212245
Metionin	4630954	9241849	0,501085	876,8991465
Valin	8097468	6708633	1,207022	2112,288599
Phe alanin	3626705	7112369	0,509915	892,351585
Ileusin	6128111	10277625	0,596258	1043,450627
Leusin	9347987	6532151	1,431073	2504,378305
Lisin	7835017	1435243	5,459018	9553,281047

- Perhitungan kandungan asam amino ikan peperek :
 - Dalam 20 μL mengandung 1483,355 μg
 - Dalam 1 mL mengandung 74167,74 μg
 - Dalam 1 mL atau 60 mg mengandung 0,074168 gr

- Dalam 1 gr mengandung 1,236129 gr
- Dalam 100 gr mengandung 123,6129 gr

Profil AA	ppm	µg/mL	gr/mL	gr/gr	gr/100 gr
Aspartat	1483,354804	74167,74	0,074168	1,236129	123,6129
Glutamik	1790,038291	89501,91	0,089502	1,491699	149,1699
Serin	498,4393815	24921,91	0,024922	0,415366	41,5366
Histidin	153,9419777	7697,099	0,007697	0,128283	12,8283
Glisin	519,9896922	259999,48	0,0259999	0,433331	43,3317
Arginin	772,0169449	38600,85	0,038601	0,643347	64,3347
Alanin	795,1531391	39757,66	0,039758	0,662633	66,2633
Tirosin	670,3296011	33516,48	0,033516	0,558608	55,8608
Valin	968,559951	48428	0,048428	0,807133	80,7133
Fenilalanin	338,1647873	16908,24	0,016908	0,281804	28,1804
Isoleusin	282,4912614	14124,56	0,014125	0,235416	23,5416
Leusin	1108,030073	55401,5	0,055402	0,923366	92,3366
Lisin	689,9575542	34497,88	0,034498	0,574966	57,4966

- Skor asam amino esensial HPI ikan peperek berdasarkan NRC =

$$\frac{\text{skor asam amino HPI peperek (g/ 100g)}}{\text{NRC}}$$

- Skor asam amino esensial HPI ikan peperek berdasarkan FAO/WHO =

$$\frac{\text{skor asam amino HPI peperek (g/ 100g)}}{\text{FAO/WHO}}$$

Profil AA	Kandungan AA (g/100gr)	NRC	Skor AA	FAO/WHO	Skor AA
Histidin	12,8285	2,1	6,108809524	2	6,41425
Arginin	64,3347	1,31	49,11045802	5	12,86694
Metionin	-	3,1	-	3,5	-
Valin	80,7133	3,6	22,42036111	5,42	14,89175277
Fenilalanin	28,1804	6,5	4,335446154	4,29	6,568857809
Isoleusin	23,5409	2,5	9,41636	4	5,885225
Leusin	92,3358	3,3	27,98054545	7	13,19082857
Lisin	57,4965	5,7	10,08710526	5,5	10,45390909
Threonin	-	3,9	-	4	-
Triptofan	-	0,8	-	1,21	-

- Perhitungan kandungan asam amino hidrolisat ikan peperek :

- Dalam 20 µL mengandung 2863,473736 µg
- Dalam 1 mL mengandung 143173,7 µg
- Dalam 1 mL atau 1 g mengandung 0,143173687 gr

- Dalam 100 g sampel mengandung 14,3173687 g glutamic

Profil AA	ppm	µg/mL	gr/mL	gr/100 gr
Glutamic	2863,473736	143173,7	0,143173687	14,3173687
Histidin	1356,768298	67838,41	0,067838415	6,783841
Glisin	2904,472469	145223,6	0,145223623	14,52236
Alanin	15304,58579	765229,3	0,765229289	76,52293
Tirosin	5543,212245	277160,6	0,277160612	27,71606
Metionin	876,8991465	43844,96	0,043844957	4,384496
Valin	2112,288599	105614,4	0,10561443	10,56144
Phe alanin	892,351585	44617,58	0,044617579	4,461758
Ileusin	1043,450627	52172,53	0,052172531	5,217253
Leusin	2504,378305	125218,9	0,125218915	12,52189
Lisin	9553,281047	477664,1	0,477664052	47,76641

- Skor asam amino esensial HPI ikan peperek berdasarkan NRC =

$$\frac{\text{skor asam amino HPI peperek (g/ 100g)}}{\text{NRC}}$$

- Skor asam amino esensial HPI ikan peperek berdasarkan FAO/WHO =

$$\frac{\text{skor asam amino HPI peperek (g/ 100g)}}{\text{FAO/WHO}}$$

Profil AA	Kandungan AA (g/100gr)	NRC	Skor AA	FAO/WHO	Skor AA
Histidin	6,783841	2,1	3,230401	2	3,3919205
Arginin	-	1,31	-	5	-
Metionin	4,384496	3,1	1,414353	3,5	1,252713143
Valin	10,56144	3,6	2,933734	5,42	1,948605166
Fenilalanin	4,461758	6,5	0,686424	4,29	1,04003683
Isoleusin	5,217253	2,5	2,086901	4	1,30431325
Leusin	12,52189	3,3	3,794513	7	1,788841429
Lisin	47,76641	5,7	8,380071	5,5	8,684801818
Threonin	-	3,9	-	4	-
Triptofan	-	0,8	-	1,21	-