

KARAKTERISASI DIALISAT EKSTRASELULAR KHAMIR LAUT  
DENGAN BERAT MOLEKUL >25 kDa YANG DIDIALISIS PADA pH  
8 DAN APLIKASINYA DALAM PEMBUATAN HIDROLISAT  
PROTEIN IKAN PEPEREK (*Leiognathus sp*)

PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN  
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERIKANAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Oleh:  
MUHAMMAD IMAM SYAFII  
NIM. 0710830046



FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2012

KARAKTERISASI DIALISAT EKSTRASELLULAR KHAMIR LAUT  
DENGAN BERAT MOLEKUL >25 kDa YANG DIDIALISIS PADA  
pH 8 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



FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2012

KARAKTERISASI DIALISAT EKSTRASELLULAR KHAMIR LAUT  
DENGAN BERAT MOLEKUL >25 kDa YANG DIDIALISIS PADA  
pH 8 DAN APLIKASINYA DALAM PEMBUATAN HIDROLISAT  
PROTEIN IKAN PEPEREK (*Leiognathus* sp.)

Oleh:  
MUHAMMAD IMAM SYAFII  
NIM. 0710830046

Telah dipertahankan didepan pengaji  
padat tanggal 24 Januari 2012  
dinyatakan telah memenuhi syarat

Mengetahui,  
Dosen Pengaji I

(Ir. Kartini Zaelanie, MP.)  
NIP. 195550503 198503 2 001  
Tanggal: \_\_\_\_\_

Dosen Pengaji II

(Dr. Ir. Hartati Kartika N, MS.)  
NIP. 19640726 198903 2 004  
Tanggal: \_\_\_\_\_

Menyetujui

Dosen Pembimbing I

(Prof. Ir. Sukoso, M.Sc. Ph. D.)  
NIP. 19640919 198903 1 002  
Tanggal: \_\_\_\_\_

Dosen Pembimbing II

(Dr. Ir. Muhamad Firdaus, MP.)  
NIP. 19680919 200501 1 001  
Tanggal: \_\_\_\_\_

Ketua Jurusan

(Dr. Ir. Happy Nursyam, MS)  
NIP. 19600322 198601 1 001  
Tanggal: \_\_\_\_\_

## RINGKASAN

**MUHAMMAD IMAM SYAFII** Karakterisasi Dialisat Ekstraselular Khamir Laut dengan Berat Molekul > 25 kDa yang Didialis pada pH 8 dan Aplikasinya dalam Pembuatan Hidrolisat Protein Ikan Peperek (*Leiognathus sp*) dibawah bimbingan **Prof. Ir. SUKOSO, M.Sc. Ph.D dan Dr. Ir. MUHAMAD FIRDAUS, MP**

*Yeast* merupakan mikroorganisme yang mengandung protease yang mampu mendegradasi protein menjadi peptida atau asam amino. Beberapa *yeast* yang dilaporkan dapat menghasilkan protease alkali yaitu meliputi: *Candida lipolytica*, *Yarrowia lipolytica*, dan *Aureobasidium pullulans* (Tobeet et al., 1976; Ogrydziak, 1993; Donaghys dan McKay, 1993). Terutama, pada enzim ekstraselular dari *Y. Lipolytica* dalam kondisi optimal dapat mencapai beberapa gram per liter (Barth dan Garlardin, 1996).

Protease merupakan enzim yang berperan dalam reaksi pemecahan protein. Enzim pada umumnya dihasilkan didalam sel, beberapa diekstrak melalui dinding sel dan dapat berfungsi diluar sel. Jadi, dikenal dua tipe enzim yaitu enzim ekstraselular (berfungsi diluar sel) dan enzim intraselular (berfungsi didalam sel). Untuk memisahkan protein enzim tertentu dari ekstrak kasar yang mengandung banyak unsur lain maka dilakukan isolasi atau pemurnian enzim (Aulanni'am, 2004).

Pemurnian dilakukan dengan metode sentrifugasi pada kecepatan dan gaya berat tertentu sehingga sel-sel mikroorganisme mengendap dan supernatant merupakan cairan yang berisi enzim didapatkan (Rahayu, 1991). Metode pemurnian yang digunakan adalah pengendapan dengan konsentrasi garam bervariasi (Aulanni'am, 2005). Pemurnian enzim dapat dilakukan berdasarkan sifat-sifat enzim sebagai protein yang berbeda dalam hal kelarutan, muatan serta ukuran atau berat molekulnya (Lehninger, 1995). Garam yang tersisa pada endapan enzim dipisahkan dengan dialisis (McKee and McKee, 2003). Dialisis merupakan proses pemisahan molekul yang lebih besar melalui membran semipermeabel (Sorensen et al., 1999).

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan, antara lain : untuk mengetahui karakteristik dialisat ekstraseluler khamir laut dengan berat molekul >25kDa yang didialis pada pH 8 dengan parameter: konsentrasi protein, aktivitas enzim, kinetika enzim, selain itu untuk mengetahui kemampuan dialisat ekstraselular khamir laut dengan berat molekul >25 kDa yang didialis pada pH 8 dalam menghidrolisis ikan peperek (*Leiognathus sp*), dengan parameter : derajat hidrolisis, berat molekul, profil asam amino, dan skor asam amino esensial.

Metode yang digunakan untuk karakterisasi dialisat ekstraselular khamir laut adalah dengan metode eksploratif. Metode penelitian ini digunakan untuk mencari ide-ide baru atau hubungan-hubungan baru. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui karakteristik dialisat ekstraselular khamir laut dan karakteristik hidrolisat protein ikan peperek (*Leiognathus sp*) yang dihidrolisis dengan dialisat ekstraselular khamir laut.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa karakteristik dialisat ekstraseluler khamir laut dengan berat molekul >25kDa yang didialis pada pH 8 memiliki konsentrasi protein 70,5 mg/mL, aktivitas enzim (aktivitas 67mU/mL per menit dan aktivitas spesifik 0,950mU/mg), kinetika enzim ( $V_{\text{maks}} 8,423 \text{ mmol/menit/mg}$  dan  $K_M 2,241 \times 10^3 \text{ mM}$ ). Dialisat ekstraselular khamir laut memiliki kemampuan menghidrolisis ikan peperek, dengan parameter : derajat hidrolisis sebesar 15% pada kondisi optimasi pH 12; suhu 50°C selama 62 menit, berat molekul antara 4-157 kDa. Analisa profil asam amino menunjukkan bahwa ikan peperek mengandung 13 macam asam amino yaitu aspartat, glutamat, serin, histidin, glisin, arginin, alanin, tirosin, valin, fenilalanin, isoleusin, leusin, lisin dan hidrolisat protein ikan peperek mengandung 5 macam asam amino yaitu glisin, fenilalanin,



ileusin, leusin, lisin. Skor asam amino ikan peperek yang dihidrolisis dengan dialisat ekstraselular khamir laut lebih tinggi bila dibandingkan dengan ikan peperek yang dihidrolisis dengan ekstraselular khamir laut.

Perlu penelitian lebih lanjut mengenai teknik pemurnian protease yang terkandung dalam ekstraseluler khamir laut dan sebaiknya dalam proses pembuatan hidrolisat protein ikan perlu ditambahkan dialisat ekstraseluler khamir laut, karena dapat menghasilkan konsentrasi asam amino yang tinggi.



## KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas rahmat, karuniaNya, hidayah dan izinNya sehingga penulis dapat menyelesaikan pembuatan skripsi ini yang berjudul “Karakterisasi Dialisat Ekstraselular Khamir Laut dengan Berat Molekul > 25 kDa yang Didialisis pada pH 8 dan Aplikasinya dalam Pembuatan Hidrolisat Protein IkanPeperek (*Leiognathus*sp)”.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa usulan ini tidak akan tersusun tanpa bantuan dari berbagai pihak, rasa hormat dan terima kasih penulis sampaikan kepada :

1. Prof. Ir. Sukoso, M.Sc. Ph.D selaku dosen pembimbing 1 dan Dr. Ir. Muhamad Firdaus, MP sebagai dosen pembimbing 2 yang telah memberikan bimbingan dan pengarahannya.
2. Ir. Kartini Zaelanie, MP selaku dosen penguji 1 dan Dr. Ir. Hartati Kartika N, MS. Selaku penguji 2 yang telah meluangkan waktunya untuk member masukan.
3. Ibuku tercinta, neng Us, dan semua saudara-saudaraku serta seluruh keluarga besar yang telah memberikan motivasi dan doanya.
4. Bapak Sudomo, Ibu Kartikasari dan Bapak Darwin, selaku analis yang telah membantu menganalisis.
5. Seluruh teman-teman THP 2007 atas bantuan dan semangat yang telah diberikan selama pengerjaan skripsi ini.
6. Semua pihak yang tidak mungkin penulis sebutkan satu per satu yang telah banyak membantu hingga skripsi ini dapat terselesaikan.

Akhirnya dengan segala kerendahan hati, penulis menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini masih banyak kekurangannya, Oleh sebab itu, saran dan kritik yang membangun sangat diharapkan untuk penelitian lanjutan di masa mendatang. Harapan penulis semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi penulis dan pembaca.

Malang, Januari2012

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>LEMBAR PENGESAHAN .....</b>	<b>i</b>
<b>RINGKASAN .....</b>	<b>ii</b>
<b>KATA PENGANTAR .....</b>	<b>iv</b>
<b>DAFTAR ISI .....</b>	<b>v</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>vii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR .....</b>	<b>viii</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	<b>ix</b>
 <b>BAB 1. PENDAHULUAN .....</b>	 <b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Perumusan Masalah .....	5
1.3 Tujuan Penelitian .....	6
1.4 Hipotesis .....	7
1.5 Kegunaan Penelitian .....	7
1.6 Tempat dan Waktu Penelitian .....	8
 <b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	 <b>9</b>
2.1 Khamir Laut .....	9
2.2 Protease .....	10
2.3 Isolasi dan Pemurnian Enzim .....	14
2.4 Hidrolisat Protein Ikan .....	17
 <b>BAB 3. MATERI DAN METODE PENELITIAN .....</b>	 <b>20</b>
3.1 Materi Penelitian .....	20
3.1.1 Bahandan Alat Penelitian .....	20
3.2 Metode Penelitian .....	21
3.3 Prosedur Penelitian .....	22
3.3.1 Kultur Khamir Laut .....	22
3.3.2 Ekstraksi Khamir Laut .....	22
3.3.3 Pemurnian Enzim Kasar Protease Khamir Laut .....	24
a. Pengendapan dengan Amonium Sulfat .....	24
b. Dialisis .....	26
3.3.4 Karakterisasi Dialisat Ekstraselular Khamir Laut .....	29
a. Penentuan Konsentrasi Protease Khamir Laut .....	29
b. Penentuan Aktivitas Protease Khamir Laut .....	31
c. Penentuan $K_m$ dan $V_{max}$ Protease Ekstrak Khamir Laut .....	35
3.3.5 Karakterisasi Hidrolisat Protein Ikan .....	38
a. Penentuan Derajat Hidrolisis .....	38
b. Analisis Berat Molekul Protein Hidrolisat Ikan Peperek .....	40
c. Analisis Profil Asam Amino Ikan Peperek dengan HPLC .....	43
 <b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	 <b>47</b>
4.1 Sel Khamir Laut .....	47

4.2 Karakteristik Dialisat Khamir Laut .....	48
4.3 Hidrolisis Dialisat Ekstraselular Khamir Laut pada Protein Ikan Peperek .....	51
4.3.1 Derajat Hidrolisis (DH) .....	52
4.3.1.1 Waktu .....	52
4.3.1.2 pH .....	53
4.3.1.3 Suhu .....	54
4.3.2 Berat Molekul Hidrolisat Protein Ikan .....	55
4.3.3 Asam Amino Hidrolisat Protein Ikan .....	58
4.3.4 Skor Asam Amino Essensial Hidrolisat Protein Ikan .....	61
<b>BAB 5. PENUTUP .....</b>	<b>63</b>
(a) Kesimpulan .....	63
(b) Saran .....	63
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>64</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>71</b>



## DAFTAR TABEL

	Halaman
1. Klasifikasiprotease .....	11
2. Pengenceranlarutanstok BSA .....	30
3. Prosedurpengukuranaktivitas protease .....	34
4. Konsentrasisubstratikanpeperekdenganpengenceran.....	36
5. Komposisi gel pemisah ( <i>Separating Gel</i> ) .....	41
6. Komposisi gel pengumpul ( <i>Stacking Gel</i> ).....	42
7. Gradienluen .....	44
8. SkorAsam Amino essensialberdasarkan NRC dan FAO .....	46
9. Karakteristikestrakkasarkhamirlautdandialisatkhamirlaut.....	49
10. BeratMolekul (kDa) pita peptidaikanpeperekdanhidrolisat protein ikanpeperek yang dihidrolisisdengandialisatekstrasselularkhamirlaut.	57
11. Kandunganasamamino ikanpeperekdan HPI (ikanpeperek yang dihidrolisisdengandialisatekstrasselularkhamirlautdanikanpeperek yang dihidrolisisdengan starter khamirlautmix) .....	60
12. Skorasam amino esensial HPI .....	56



## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
1. Selkhamirlaut .....	47
2. Kurva Lineweaver-Burk dialisatekstraselular khamirlaut .....	50
3. Persentase derajat hidrolisis dialisatekstraselular khamirlaut pada ikan neperek dalam berbagai waktu hidrolisis .....	52
4. Persentase derajat hidrolisis dialisatekstraselular khamirlaut pada ikan neperek dalam berbagai pH hidrolisis .....	53
5. Persentase derajat hidrolisis dialisatekstraselular khamirlaut pada ikan neperek dalam berbagai suhu hidrolisis .....	54
6. Profil pita peptida : (a) Penanda protein ( <i>Marker</i> ), (b) Ikan peperek, (c) HPI tanpa pengenceran, dan (d) HPI dengan pengenceran .....	56
7. Kromatogram profil asam amino ikan peperek .....	59
8. Kromatogram profil asam amino hidrolisat protein ikan peperek .....	59

## DAFTAR LAMPIRAN

Halaman

1. Penghitungan konsentrasi protein dari dialisat ekstraselular khamir laut dengan spektrofotometer ..... 71
2. Penghitunganaktivitas protease dari dialisat ekstraselular khamir laut dengan spektrofotometer ..... 73
3. Penghitungan kecepatan maksimum ( $V_{MAKS}$ ) dan konstanta Michaelis-Menten ( $K_M$ ) ..... 74
4. Pengitunganderajathidrolisis (DH) ..... 80
5. Penghitunganberatmolekul (SDS-PAGE) ..... 92
6. Penghitunganskorasam amino..... 95



## 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

*Yeast* atau khamir merupakan mikroorganisme yang mengandung protease yang mampu mendegradasi protein menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana (asam-asam amino). Menurut Putranto (2005), beberapa *yeast* dapat memproduksi protease ekstraselular adalah *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Pichia*, *Hansenula*, dan *Metschnikowia*, danyeast yang dapat menghasilkan protease alkali meliputi: *Candida lipolytica*, *Yarrowia lipolytica* dan *Aureobasidium pullulans* (Tobe *et al.* 1976; Ogrydziak, 1993; Donaghy dan McKay, 1993).

Khamir laut memiliki potensi untuk dijadikan bahan penghidrolisis. Ping *et al.* (2006) mengungkapkan bahwa khamir laut (*Marine Yeast*) strain 10 yang diisolasi dari sedimen laut dekat Qingdao, China menghasilkan alkaline protease yang tinggi. Ni *et al.* (2008) juga mengungkapkan bahwa strain HN2-3 bisa menghasilkan sejumlah besar ekstraselular alkaline protease strain *Aureobasidium Pullulans*.

Protease merupakan enzim yang berperan dalam reaksi pemecahan protein. Protease termasuk dalam kelompok hidrolase karena dalam reaksinya melibatkan air pada ikatan substrat spesifik. Berdasarkan cara hidrolisinya, protease dibedakan menjadi proteinase dan peptidase. Proteinase menghidrolisis molekul protein menjadi polipeptida, sedangkan peptidase menghidrolisis fragmen polipeptida menjadi asam amino (Rao *et al.* 1998).

Enzim pada umumnya dihasilkan didalam sel, beberapa diekstrak melalui dinding sel dan dapat berfungsi diluar sel. Adadua tipe enzim yang dikenal

yaitu enzim ekstraselular (berfungsi diluar sel) dan enzim intraselular (berfungsi didalam sel). Fungsi utama enzim ekstraselular adalah mengubah nutrien disekitarnya sedemikian hingga nutrien tersebut masuk kedalam sel. Enzim intraselular mensintesis bahan selular atau menguraikan nutrien untuk menyediakan energi bagi kebutuhan sel. Menurut Priest(1985), produksi enzim ekstraselular lebih menguntungkan dibandingkan dengan enzim intraselular karena dihasilkan dalam jumlah lebih besar dan lebih mudah diperoleh melalui suatu rangkaian pemisahan dan pemurnian sederhana. Untuk memisahkan protein enzim tertentu dari ekstrak kasar yang mengandung banyak unsur lain maka dilakukan isolasi atau pemurnian enzim (Aulanni'am, 2005)

Wiyanto dan Sukoso, (2003) telah mengisolasi, mengkultur dan menganalisis marine yeast (*marine yeast*) dari perairan laut Jawa. Proses isolasi enzim mengandung pengertian pelepasan enzim dari sel yang dapat dilakukan secara mekanik, fisis, kimiawi, dan enzimatis melalui penghancuran membran dan dinding sel. Isolasi dilakukan dengan menggunakan medium yang mengandung kasein, karena merupakan substrat yang baik untuk mengisolasi bakteri penghasil protease dan menginduksi sintesis protease alkalin (Ward, 1983; Fujiwara dan Yamamoto, 1987).

Sentrifugasi dan dialisis merupakan salah satu teknik isolasi dan pemurnian enzim ekstraselular yang ekonomis dan mudah. Menurut Lodish (2004), prinsip dasar sentrifugasi adalah pemisahan dua partikel dalam suspensi (sel, organel, atau molekul) yang memiliki massa dan densitas berbeda sehingga akan mengalami sedimentasi pada dasar tabung dengan laju yang berbeda. Rahayu (1990) menambahkan bahwa sentrifugasi dilakukan pada kecepatan dan gaya berat tertentu sehingga sel-sel mikroorganisme mengendap dan supernatan

merupakan cairan yang berisi enzim. Isolasi enzim dilakukan pada suhu rendah dan campuran ditambah larutan penyanga untuk mempertahankan kestabilan enzim dan meminimalkan protease kehilangan aktivitas spesifiknya.

Metode yang sering digunakan dalam pemurnian enzim antara lain pengendapan, filtrasi membran, kromatografi adsorbs, kromatografi afinitas, dan filtrasi gel (Smith, 1993). Proses pengendapan dengan menggunakan amonium sulfat lebih disukai karena memiliki beberapa keuntungan, antara lain : kelarutan yang tinggi, tidak mempengaruhi struktur protein, dan harga relatif murah (Suhartono, 1989). Sorensen *et al.* (1999), menambahkan bahwa metode pengendapan dengan konsentrasi garam bervariasi disertai dengan pengadukan pada suhu rendah. Garam yang ditambahkan dapat berupa amonium sulfat, natrium sulfat, natrium fosfat, dan sebagainya tergantung pada jenis enzim.

Garam yang tersisa pada endapan enzim dipisahkan dengan dialisis (McKee dan James, 2003). Dialisis adalah teknik yang digunakan untuk memisahkan senyawa antara BM-rendah dan senyawa BM-tinggi (*desalting*) melalui membran semipermeabel. Pada proses ini terjadi perpindahan garam amonium sulfat yang mempunyai berat molekul yang lebih kecil dari sampel menuju larutan *buffer*. Perbedaan kecepatan difusi melalui membran terjadi karena adanya perbedaan ukuran molekul sehingga garam akan terpisah dari protein (Sorensen *et al.* 1999).

Proses dialisis berlangsung berdasarkan sifat membran semipermeabel, dimana molekul besar protein akan bertahan sedangkan molekul kecil dapat lolos melalui pori membran dan larut dalam sistem pelarut dialisis yang digunakan. Proses dialisis dipengaruhi oleh perbedaan konsentrasi zat terlarut di kedua sisi membran. Dengan demikian selalu diikuti pergantian larutan *buffer* selama

dialisis dan pengadukan sampai terjadi keseimbangan. Untuk menjaga stabilitas protein, dialisis dilakukan pada suhu 4-8°C.

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.

Hidrolisat Protein Ikan (HPI) adalah produk cairan yang dibuat dari ikan dengan penambahan enzim proteolitik untuk mempercepat proses hidrolisis dalam kondisi terkontrol dengan hasil akhir berupa campuran komponen protein. Berbagai sumber protein, baik protein nabati maupun protein hewani dapat digunakan sebagai bahan mentah untuk pembuatan protein hidrolisat. Kelebihan penggunaan daging ikan sebagai bahan baku pembuatan hidrolisat protein adalah dagingnya berserat seperti hewan mamalia darat, tetapi seratnya lebih halus dan lebih pendek ukurannya, serta komposisi proteinnya cukup lengkap, sehingga dapat meningkatkan mutu produk akhir HPI (Pigott dan Tucker, 1990).

Hidrolisat protein didefinisikan sebagai protein yang mengalami degradasi hidrolitik dengan asam atau basa kuat dengan hasil akhir berupa campuran beberapa hasil. Bila hidrolisis dilakukan dengan sempurna maka akan diperoleh hidrolisat yang terdiri dari campuran 18 sampai 20 macam asam amino. Produk akhir dapat berbentuk cair, pasta atau bubuk tepung yang bersifat higroskopis (Pigott dan Tucker, 1990).

Alternatif pemanfaatan ikan peperek digunakan sebagai produk hidrolisat protein ikan, merupakan salah satu cara untuk meningkatkan nilai nutrisi asam amino. Faharudin (2002), melaporkan bahwa penggunaan khamir laut sebagai



enzim hidrolisis pada pembuatan HPI peperek dapat meningkatkan nilai nutrisi asam amino(Pigott dan Tucker, 1990).

Penelitian karakteristik ekstrak kasar khamir laut dalam hidrolisis protein ikan peperek telah dilakukan oleh Rois (2010), yang mendapati protease ekstrak kasar dari khamir laut memiliki nilai aktivitas yang rendah yaitu  $21,5 \text{ mU menit}^{-1} \text{ mL}^{-1}$ . Oleh karena itu perlu dilakukan pemurnian ekstraselular protease khamir laut salah satunya dengan menggunakan metode dialisis.

## 1.2 Perumusan Masalah

*Yeast* atau khamir merupakan mikroorganisme yang mengandungprotease yang mampu mendegradasi protein menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana (asam-asam amino). Menurut Putranto (2005), beberapa *yeast* dapat memproduksi protease ekstraselular adalah *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Pichia*, *Hansenula*, dan *Metschnikowia*,sedangkan *yeast* yang dapat menghasilkan protease alkali meliputi: *Candida lipolytica*, *Yarrowia lipolytica*, dan *Aureobasidium pullulans* (Tobe *et al.* 1976; Ogrydziak, 1993; Donaghy dan McKay, 1993).

Protease merupakan enzim proteolitik yang berperan dalam reaksi pemecahan protein. Protease termasuk dalam kelompok hidrolase karena dalam reaksinya melibatkan air pada ikatan substrat spesifik (Rao *et al.* 1998).

Sentrifugasi dan dialisis merupakan salah satu teknik isolasi dan pemurnian enzim ekstraselular yang ekonomis dan mudah. Menurut Lodish (2004), prinsip dasar sentrifugasi adalah pemisahan dua partikel dalam suspensi (sel, organel, atau molekul) yang memiliki massa dan densitas berbeda sehingga akan mengalami sedimentasi pada dasar tabung dengan laju yang



berbeda. Sedangkan dialisis adalah teknik yang digunakan untuk memisahkan senyawa antara BM-rendah dan senyawa BM-tinggi (*desalting*) melalui membran semipermeabel. Pada proses ini terjadi perpindahan garam amonium sulfat yang mempunyai berat molekul yang lebih kecil dari sampel menuju larutan *buffer* (Sorensen *et al.* 1999).

Pemurnian protease alkali dari isolat asli *Aspergillus niger* yang mempunyai nilai aktivitas protease maksimum 80,6 U/ml yang dilakukan pada pH 8,5, akan meningkatkan aktivitas enzim tersebut menjadi 81,1 U/ml. Pemurnian enzim dapat dilakukan dengan metode dialisis yang menggunakan kantong selofan 25 kDa MWCO. Menurut Schmidt *et al.* (2007) tabung dialisis dengan *molecular weight cutoff* (MWCO) 25 kDa dapat digunakan untuk memindahkan ion nitrogen, asam amino, atau peptida. Pemurnian bertujuan untuk menghasilkan aktivitas spesifik semaksimal mungkin dengan pemilihan teknik yang tepat.

Ekstrak kasar khamir laut diketahui memiliki aktivitas protease, namun nilai aktivitasnya masih rendah. Peningkatan aktivitas protease tersebut dapat dilakukan dengan memurnikannya secara dialisis. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian tentang pemurnian ekstrak khamir laut dengan dialisis dan memanfaatkannya sebagai penghidrolisis protein guna meningkatkan aktivitas proteasenya dengan cara dialisis.

### 1.3 Tujuan Penelitian

- Mendapatkan karakteristik dialisat ekstraselular khamir laut yang didialisis pada pH 8 dengan kantong selofan berukuran 25 kDa MWCO.



- Mendapatkan kemampuan dialisat ekstraselular khamir laut hasil dialisis pada pH 8 dengan kantong selofan berukuran 25 kDa MWCO dalam menghidrolisis ikan peperek (*Leiognathus sp.*).

#### **1.4 Hipotesis**

- Ekstraselular khamir laut yang didialisis pada pH 8 dengan kantong selofan berukuran 25 kDa MWCO mempunyai karakteristik protease.
- Ekstraselular khamir laut yang dimurnikan secara dialisis pada pH 8 dengan kantong selofan berukuran 25 kDa MWCO dapat menghidrolisis ikan peperek

#### **1.5 Kegunaan Penelitian**

Kegunaan penelitian ini diharapkan dapat memberi manfaat bagi;

- Pemerintah, sebagai bahan pertimbangan terhadap kebijakan pengembangan produk hasil perikanan terutama dari produk perikanan yang kurang ekonomis.
- Masyarakat, sebagai sumber informasi bahwa khamir laut dapat menghidrolisis protein ikan menjadi produk hidrolisat protein ikan.
- Mahasiswa, sebagai bahan informasi dan referensi dalam melakukan penelitian berikut mengenai potensi khamir laut sebagai bahan untuk menghidrolisis protein ikan.

#### **1.6 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Parasit Penyakit Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Laboratorium Kimia Fakultas MIPA, Laboratorium



Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, dan Laboratorium Kimia Organik Fakultas MIPA, Universitas Gajah Mada, Yogyakarta, pada November 2010 sampai Maret 2011.



## 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Khamir Laut

Khamir adalah organisme *uniselular* dari golongan jamur. Khamir mempunyai sifat *kemoautotrof*, bereproduksi seksual dengan spora dan aseksual dengan pertunasan atau pembelahan atau kombinasi keduanya (Kreger-Van Rij, 1984). Morfologi dari khamir yaitu : *uniselular* (bersel tunggal), ukuran diameter bervariasi antara 3-5  $\mu\text{m}$ , struktur eukariotik (memiliki inti membran), memiliki dinding sel yang serupa dengan bakteri, sitoplasma, memiliki inti bebas (*discrete nukleus*), memiliki vakuola yang berisi sejumlah cairan (Prescott dan Dunn, 1959) tidak dilengkapi *flagellum* atau organ-organ penggerak lainnya (Pelczar dan Chan, 1989). Bentuk sel khamir laut bermacam-macam, yaitu : bulat, oval, silinder, ogival, triangular, bentuk botol, apikulat, membentuk *pseudomisellum*, (Fardiaz, 1992).

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* dan *Phycomycetes* adalah fungi berfilamen, karena tidak ada khamir yang masuk termasuk dalam subdivisi ini (Reed, 1991).

Khamir laut (*marine yeast*) adalah khamir yang mampu hidup di lingkungan bersalinitas tinggi. Karakteristik khamir laut tidak jauh berbeda dengan khamir pada umumnya (kecuali habitat). Kebutuhan nutrisinya meliputi



beberapa mineral, sumber nitrogen dan vitamin (Bamforth, 2005). Suhu optimum pertumbuhannya berkisar antara 25-30°C, dengan suhu maksimum 35-47°C. Khamir lebih menyukai tumbuh pada keadaan asam yaitu pada pH 4-4,5 dan tidak dapat tumbuh pada medium alkali kecuali telah beradaptasi (Fardiaz, 1992).

Khamir laut yang diisolasi dari lingkungan laut dapat tumbuh dengan baik pada medium yang disiapkan dengan air laut dibandingkan pada medium yang disiapkan dengan air tawar. Chi *et al.* (2007), mengungkapkan bahwa *Aureobasidium pullulans* yang diisolasi dari sedimen pantai di Qingdao, China memiliki aktivitas protease 623.1 U/mg.Khamir laut dari Pantai Jawa Timur diisolasi pada tahun 2003 (Wiyanto dan Sukoso, 2003) dan dapat dimanfaatkan sebagai starter pada pembuatan hidrolisat protein ikan (Waluyo *et al.* 2004; Prihatmoko *et al.* 2004).

## 2.2 Protease

Protease adalah enzim yang mengkatalisis pemecahan ikatan peptida dalam peptida, polipeptida, dan protein menjadi peptida yang lebih sederhana dan asam amino (Naiola *et al.* 1996). Protease merupakan enzim yang dapat ditemukan di semua organisme baik tanaman, hewan, maupun mikroba. Protease yang bersumber dari tanaman antara lain: papain, bromelin, dan keratinase, sedang yang bersumber dari hewan antara lain: tripsin, kimotripsin, pepsin, dan renin (Boyer, 1971).

Menurut komisi nomenklatur dari Internasional Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB), protease dikelompokkan pada subkelompok 4 dari kelompok enzim ketiga (hidrolase). Protease sendiri diklasifikasikan berdasarkan tiga kriteria, yaitu tipe reaksi yang dikatalisis, struktur kimia sisi aktif, dan evolusi



dari struktur. Berdasarkan pada sisi aktif dari enzim, protease dibagi menjadi eksopeptidase dan endopeptidase, seperti terlihat pada Tabel 1.

**Tabel 1. Klasifikasi protease**

Protease	Penomeran Komisi Eropa
Eksopeptidase	3.4.11
Aminopeptida	3.4.14
Dipeptida	3.4.14
Tripeptida	3.4.16-3.4.18
Karboksipeptidase	3.4.16
Protease tipe serin	3.4.17
Protease metal	3.4.18
Protease tipe sistein	3.4.15
Peptida	3.4.13
Dipeptida	3.4.19
Omega peptidase	3.4.19
Endopeptidase	3.4.21-3.4.34
Protease serin	3.4.21
Protease sistein	3.4.22
Protease aspartik	3.4.23
Protease Metal	3.4.24
Mekanisme katalitik endopeptidase yang tidak diketahui	3.4.99

Sumber : Rao *et al.* (1998)

Protease (E.C.3.4) merupakan enzim golongan hidrolase yang berperan dalam reaksi pemecahan ikatan peptida pada molekul protein. Enzim ini mengkatalisis reaksi hidrolisis, yaitu reaksi yang melibatkan unsur air pada ikatan spesifik substrat. Secara umum protease dapat dibagi dalam dua golongan, yaitu proteinase dan peptidase. Proteinase mengkatalisis hidrolisis molekul protein menjadi fragmen-fragmen besar, sedangkan peptidase mengkatalisis fragmen polipeptida menjadi asam amino (Suhartono, 1992).

Dilihat dari letak pemutusan ikatan peptida, protease dibedakan menjadi endopeptidase atau proteinase (EC 3.4.21-99) dan eksopeptidase (EC 3.4.11-21). Endopeptidase memutuskan ikatan peptida yang berada di dalam rantai



protein sehingga dihasilkan peptida dan polipeptida, sedangkan eksopeptidase menguraikan protein dari ujung rantai sehingga dihasilkan satu asam amino dan sisa peptida. Berdasarkan sifat kimia dan sisi aktifnya dikenal empat golongan protease yaitu serin (EC 3.4.21), sistein (EC 3.4.22), aspartat (EC 3.4.23), dan metallo endopeptidase (EC 3.4.24) (Otto dan Schirmeister, 1997).

Fogarty (1979), membagi protease mikroba berdasarkan pH aktivitas optimumnya, yaitu protease asam (pH 2-6), protease netral (pH 6-8), dan protease alkali (pH 8-13). Protease asam biasanya dimanfaatkan dalam pembuatan keju (Rao *et al.* 1998). Protease netral biasanya dimanfaatkan untuk industri obat-obatan dan makanan seperti pembuatan kue, bir, serta pembuatan suspensi pengganti susu sapi (Rao *et al.* 1998; Ward, 1992 dalam Meryandini, 2005). Protease alkalin secara komersial biasanya dimanfaatkan untuk campuran dalam pembuatan detergen, pembuatan bir tahan dingin (*childproofing beer*), dan protein hidrolisat (Rao *et al.* 1998; Moreira *et al.* 2001).

Suhartono (1989) membagi protease menjadi 6 golongan, yaitu aminopeptidase, karboksipeptidase, serin, thiol, asam, dan metal. Aminopeptidase mencegah protein atau peptida secara bertahap dari ujung gugus amino. Pada umumnya enzim aminopeptidase merupakan enzim intraselular. Aminopeptidase dari *Bacillus licheniformis* mempunyai berat molekul hanya 34 kDa, sedangkan aminopeptidase dari *B.stearothermophilus* mempunyai berat molekul 80-100 kDa.

Golongan karboksipeptidase dapat memecah protein dari ujung karboksil, dibagi menjadi 2 golongan yaitu karboksipeptidase yang memiliki asam amino serin pada sisi aktifnya dan karboksipeptidase metal yang memerlukan ion logam bagi aktivitas optimumnya(Fogarty, 1979).



Menurut Yatsumi dan Takenaka (2000), protease serin 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), *l-1-p-tosilamino-2-feniletil klorometilketon* (tpck), *aprotinin*, dan *fenilmetilsulfanil fluoride* (pmsf). Enzim ini mempunyai berat molekul (BM) 25.000 – 30.000 Dalton.

Protease sulfihidril (*protease thiol*, *protease sistein*) memiliki residu sulfihidril dalam lokasi aktifnya, bersifat endopeptidase dan dihambat oleh senyawa oksidator, alkilator dan logam berat. Asam *p-kloro merkuribenzoat*, *iodoasetat*, *n-etilmaleimida*, dan *leupeptin* merupakan inhibitor spesifik enzim ini. Protease dari tumbuhan dan mikroba seperti papain, fisin dan bromelin termasuk dalam golongan ini (Yatsumi dan Takenaka, 2000).

Aktivitas dari protease logam (metalloprotease) tergantung pada keberadaan logam yang umumnya memenuhi hubungan stoikiometrik dengan satu mol logam untuk tiap mol enzim. Logam tersebut misalnya magnesium (Mg), seng (Zn), kobal (Co), besi (Fe), merkuri (Hg), nikel (Ni), dan sebagainya. Enzim ini dapat dihambat oleh asam etilendiamina tetraasetat (edta) yang dapat mengikat logam, lalu menurunkan aktivitasnya (Yatsumi dan Takenaka, 2000).

Protease asam (*acid protease*) adalah salah satu jenis protease yang memiliki aktivitas tinggi, stabil pada pH asam, dan aplikasinya sangat penting dalam industri makanan (Sila *et al.* 2009). Protease ini menunjukkan spesivitas pemutusan ikatan peptida pada enam residu asam amino terakhir dengan asam amino hidrofob pada posisi pemutusan substrat. Protease asam memiliki berat molekul 30-40 kDa (Rao *et al.* 1998).

### 2.3 Isolasi dan Pemurnian Enzim

Enzim pada umumnya dihasilkan didalam sel, beberapa diekstrak melalui dinding sel dan dapat berfungsi diluar sel. Ada 2 tipe enzim yaitu enzim ekstraselular (berfungsi diluar sel) dan enzim intraselular (berfungsi didalam sel). Fungsi utama enzim ekstraselular adalah mengubah nutrien disekitarnya sedemikian rupa hingga nutrien tersebut masuk kedalam sel, sedangkan enzim intraselular mensintesis bahan selular atau menguraikan nutrien yang dibutuhkan sel. Untuk memisahkan enzim perlu dilakukan isolasi atau pemurnian (Aulanni'am,2005).

Isolasi enzim ekstraselular lebih mudah dibanding enzim intraselular karena tanpa pemecahan sel. Proses isolasi enzim mengandung pengertian pelepasan enzim dari sel yang dapat dilakukan secara mekanik, fisis, kimiawi, dan enzimatis melalui penghancuran membran dan dinding sel (Muchtadi dkk. 1992). Protease dihasilkan oleh mikroorganisme dan merupakan enzim ekstraselular yang dapat diisolasi secara sentrifugasi pada media pertumbuhan jamur dan bakteri (Schomburg and Salzman, 1993).

Proses pemisahan dengan sentrifugasi merupakan sistem pemisahan berdasarkan ukuran dan berat. Partikel dengan berat, ukuran, dan bentuk yang berbeda akan mengendap pada kecepatan yang berbeda (Suhartono, 1989). Menurut Judoamidjojo dkk. (1992), metode sentrifugasi berfungsi untuk memisahkan sel-sel dari medium biakan atau menyingkirkan hancuran sel serta pengumpulan endapan. Rahayu (1991) menambahkan bahwa sentrifugasi dilakukan pada kecepatan tertentu sehingga sel-sel mikroorganisme mengendap dan supernatan merupakan cairan yang berisi enzim. Isolasi enzim dilakukan pada suhu rendah dan campuran ditambah larutan penyangga untuk

mempertahankan kestabilan enzim dan kehilangan aktivitas enzim dapat dijaga seminimal mungkin. Enzim yang diharapkan nantinya akan berada pada lapisan air (supernatan).

Pemurnian enzim dapat dilakukan berdasarkan sifat-sifat enzim sebagai protein yang berbeda dalam hal kelarutan, muatan dan ukuran atau berat molekulnya (Lehninger, 1982). Beberapa metode pemurnian enzim adalah pengendapan, filtrasi membran, kromatografi adsorb, kromatografi afinitas, dan filtrasi gel (Mc Kee and James, 2003).

Menurut Sorensen et al. (1999), metode pengendapan dengan konsentrasi garam bervariasi dilakukan dengan menambahkan garam amonium sulfat kedalam ekstrak kasar enzim disertai dengan pengadukan pada suhu rendah. Garam yang ditambahkan dapat berupa amonium sulfat, natrium fosfat, dan sebagainya tergantung pada jenis enzim. Pengendapan dengan garam (amonium sulfat dan natrium sulfat) lebih disukai daripada pelarut organik seperti etanol dan aseton. Amonium sulfat sering digunakan karena kelarutannya tinggi, harganya murah, dan umumnya tidak mempengaruhi struktur protein atau menstabilkan protein enzim. Namun menurut Scopes (1994), kelemahan amonium sulfat tidak dapat mengendapkan seluruh protein yang telah larut dan bila mengandung logam maka akan dapat merusak enzim.

Pemilihan amonium sulfat didasarkan pada kelarutan protein yang berinteraksi polar dengan molekul air, interaksi ionik protein dengan garam dan daya tolak menolak protein yang bermuatan sama. Kelarutan protein (pada pH dan temperatur tertentu) meningkat pada kenaikan konsentrasi garam (*salting in*). Kenaikan kelarutan protein akan meningkatkan kekuatan ion larutan. Pada penambahan garam dengan konsentrasi tertentu kelarutan

protein menurun (*salting out*). Molekul air yang berikatan dengan ion-ion garam semakin banyak yang menyebabkan penarikan selubung air yang mengelilingi permukaan protein sehingga mengakibatkan protein saling berinteraksi, beragregasi, dan kemudian mengendap (Harris 1989).

*Salting out* dengan garam ini dapat digunakan untuk memisahkan protein dari komponen terlarut lainnya. Seringkali penggumpalan dengan cara *salting out* dilakukan pada suhu rendah (4°C). Enzim yang telah menggumpal dipisahkan dari supernatan dengan *centrifuge*. Enzim ini masih belum murni dan tercampur dengan protein lainnya, walaupun sudah bebas dari kontaminan non protein (Suhartono, 1989).

Aplikasi enzim yang luas menuntut adanya teknik pemurnian enzim yang ekonomis (Halimi *et al.* 2010). Pemurnian seringkali menjadi tahapan dengan biaya termahal dari keseluruhan penelitian (Bachrudin, 1999). Dialisis merupakan teknik pemurnian enzim yang murah. Pengendapan protein dengan menambahkan garam, seperti ammonium sulfat, natrium sulfat, natrium fosfat dan sebagainya dilakukan sebelum proses dialisis bertujuan untuk memisahkan komponen terlarut lainnya (Sorensen *et al.* 1999).

Rongga serabut semipermeabel pada membran dialisis sering dikenal dengan *molecular weight cut off* (MWCO). Kisaran 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).

Dialisis merupakan proses pemisahan molekul yang lebih besar melalui membran semipermeabel. Pada proses ini terjadi perpindahan garam ammonium sulfat yang mempunyai berat molekul lebih kecildari sampel menuju dalam



larutan *buffer*. Pada waktu garam bergerak melalui pori-pori membran, garam teradsorbsi pada permukaan membran dan selanjutnya bergerak dari sisi membran yang satu kesisi membran yang lain. Difusi garam terjadi karena adanya gradien konsentrasi. Perbedaan kecepatan difusi melalui membran terjadi karena adanya perbedaan ukuran molekul sehingga menyebabkan garam terpisah dari protein (Sorensen *et al.* 1999).

#### 2.4 Hidrolisat Protein Ikan

Hidrolisat didefinisikan sebagai protein yang secara kimiawi maupun biologi terpecah peptidanya menjadi ukuran yang lebih sederhana. Pigott dan Tucker (1990), menyatakan bahwa hidrolisat protein ikan adalah produk cairan atau bubuk yang dibuat dari ikan dengan penambahan enzim proteolitik untuk mempercepat proses hidrolisis dalam kondisi terkontrol dengan hasil akhir berupa campuran komponen protein. Hidrolisat protein ikan (HPI) adalah suatu produk hasil hidrolisis protein secara enzimatik dengan memanfaatkan enzim protease. Dibandingkan dengan hidrolisis secara kimia, hidrolisis enzimatik lebih menguntungkan karena tidak mengakibatkan kerusakan asam amino. Ditambahkan Clememte (2000), bahwa hidrolisis secara enzimatik menghasilkan komposisi asam amino tertentu terutama peptida rantai pendek (peptida dan tripeptida) yang mudah diabsorbsi oleh tubuh.

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).

Hidrolisat protein ikan mempunyai peranan penting di dalam fortifikasi makanan dan minuman untuk memperkaya protein dan nilai gizi makanan, sehubungan dengan tingginya tingkat kelarutan dan kecernaan. Dari beberapa penelitian diketahui bahwa penggunaan hidrolisat protein ikan secara luas digunakan sebagai bahan tambahan makanan dalam sup, kuah daging, rasa daging, makanan diet, penyedap sosis, biskuit, crackers, dan mayonaise. Hidrolisat protein ikan juga berguna sebagai bahan fortifikasi untuk memperkaya nilai gizi produk makanan suplemen terutama untuk anak-anak dan bahan pengganti albumin telur pada proses pembuatan es krim, agar-agar, serta secara fungsional dapat dikatakan sebagai bahan pengemulsi, pengembang, dan bahan pengisi (Pigot dan Tucker, 1990).

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

Hidrolisat protein ikan yang dikarakteristik dengan kelarutan tinggi di dalam air mempunyai kandungan protein yang tinggi, namun kandungan lemak dan abu

HPI sangat rendah. Penggunaan spesies ikan, enzim dan kondisi daya cerna yang berbeda, dapat menghasilkan hidrolisat yang berbeda pula. Spesies ikan yang rendah lemak merupakan bahan baku yang ideal untuk hidrolisat protein ikan. Ikan berlemak seperti ikan herring membutuhkan perlakuan dengan etanol untuk menghilangkan lemak sebelum proses hidrolisis enzimatik. Karakteristik HPI dapat dirubah dengan menggunakan enzim spesifik dan menkondisikan suhu, pH dan waktu (Owens *et al.* 1986; Shahidi *et al.* 1997).



### 3. MATERI DAN METODE PENELITIAN

#### 3.1 Materi Penelitian

##### 3.1.1 Bahan dan Alat Penelitian

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah khamir laut yang dihasilkan dari proseskultur dan ikan peperek yang didapatkan dari Pelabuhan Mayangan, Probolinggo, Jawa Timur. Protease didapatkan dari hasil ekstraksi khamir laut. Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian tahap pertama antara lain: karakterisasi dialisat ekstraselular khamir laut meliputi gula pasir 0,5%, pupuk daun 0,2%, kasein 0,5%, glisin NaOH 0,05 M, TCA (*trichloroacetic acid*) 10%, amonium sulfat 40%, buffer fosfat 0,1 M, buffer fosfat 0,05 M, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 5%, EDTA 50 mM, kantong selofan ukuran 25 kDa, etanol dingin, *phosphate buffer saline* (PBS), reagen biuret, CuSO<sub>4</sub>, KNaC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>, NaOH 2,5 M, BSA (*Bovine Serum Albumin*), reagen *folin-phenol ciocalteau*, aquades, dan tirosin. Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian tahap kedua meliputi: *phosphate buffer saline* (PBS), metanol, Tris HCl 1,5 M, Acrylamide 30%, kertas pH, larutan Nesler, larutan K.Na tartrat, *separating gel* (12,5%), *stacking gel* (12,5%), SDS 10%, *reducing sample buffer* (RSB), ammonium persulfat (APS), tetrametiletilendiamin (TEMED), Cooamassie Brilliant Blue, larutan O-ftatalaldehid (OPA), merkaptoetanol, HCl 6 N, NaOH 6 N, borat, marker, asam asetat glasial 10%, aquades, amonium sulfat, tablet kjeldahl, *glass wool*.

Peralatan-peralatan yang digunakan dalam penelitian tahap pertama antara lain: galon, botol bensin, aerator, selang, corong, pisau, blender, sendok, kompor, inkubator, timbangan analitik, erlenmeyer, gelas ukur, spatula, kuvet, eppendorf, micropipette, blue pippets, pH meter, baskom, falcon dan



spektrofotometer. Peralatan yang digunakan dalam penelitian tahap kedua yaitu pipet volume, magnetic stirrer, tabung reaksi, *beaker glass*, timbangan analitik, waterbath, *sentrifuge* (Hettich-mikro 22 R), *power supply*, spektrofotometer (Shimadzu UV-VIS 1.700), *vortex mixer* (Thermolyne), elektroforesis dan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC).

### 3.2 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan oleh penulis adalah metode penelitian eksploratif. Penelitian eksploratif adalah salah satu jenis penelitian yang bertujuan untuk memberikan definisi atau penjelasan mengenai konsep atau pola yang digunakan dalam penelitian. Penelitian ini untuk menjadikan topik baru lebih dikenal oleh masyarakat luas, memberikan gambaran dasar mengenai topik bahasan, menggeneralisasi gagasan dan mengembangkan teori yang bersifat tentatif, membuka kemungkinan akan diadakannya penelitian lanjutan terhadap topik yang dibahas, serta menentukan teknik dan arah yang akan digunakan dalam penelitian berikutnya (Ida, 2004).

Penelitian ini dilakukan dalam dua tahapan kerja sebagai berikut:

- Tahap pertama, karakteristik dialisat ekstraselular khamir laut yang terdiri dari penentuan konsentrasi protein, aktivitas protease, aktivitas spesifik protease, konstanta Michaelis-Menten ( $K_m$ ) dan kecepatan maksimal ( $V_{maks}$ ).
- Tahap kedua, karakteristik hidrolisat protein ikan peperek yang dihidrolisis dengan dialisat ekstraselular khamir laut, meliputi derajat hidrolisis (DH), berat molekul, profil asam amino dan penentuan skor asam amino essensial.



### 3.3 Prosedur Penelitian

#### 3.3.1 Kultur Khamir Laut

**Metode :**Wiyanto dan Sukoso (2003)

- Persiapan Bahan :

- Media air laut 15.000 mL (15 L)
- Gula pasir 0,5% dan pupuk daun 0,2% dalam 15.000 mL air laut
  - Untuk mendapatkan berat gula pasir 0,5% yang dibutuhkan dalam kapasitas volume =  $\frac{0,5}{100} \times 15.000 = 75$  gr
  - Untuk mendapatkan berat pupuk daun 0,2% yang dibutuhkan dalam kapasitas volume =  $\frac{0,2}{100} \times 15.000 = 30$  gr
- Stok khamir laut 30 mL

- Prosedur kerja:

- Air laut sebanyak 15 L disterilisasi dengan cara dipanaskan sampai mendidih ( $\pm 1$  jam)
- Didiamkan selama semalam
- Ditambahkan 75 gr gula pasir dan 30 gr pupuk daun serta 30 mL stok khamir laut dihomogenkan dengan menggunakan *stirrer*
- Diaerasi selama 7 – 10 hari
- Terdapat endapan (*marine yeast*) sebagai stok khamir laut baru

#### 3.3.2 Ekstraksi Khamir Laut

**Metode :**Chi *et al.* 2007 dengan sentrifugasi

Ekstraksi dilakukan dengan metode sentrifus (Chi *et al.* 2007; Ping *et al.* 2005). Prinsip sentrifugasi adalah pemisahan dua partikel dalam suspensi (sel, organel, atau molekul) yang memiliki berat dan densitas berbeda sehingga



akan mengalami sedimentasi pada dasar tabung dengan laju yang berbeda (Lodish, 2004). Substansi yang lebih berat akan berada di dasar, sedangkan substansi yang lebih ringan akan terletak di atas (Miller, 2000). Organel yang berukuran besar dapat diperoleh dengan cara memperlambat kecepatan sentrifugasi dan organel yang berukuran kecil dapat diperoleh dengan mempercepat kecepatan sentrifugasi (Rasdianto, 2009). Sentrifugasi diawali dengan homogenisasi untuk memecah sel tanpa merusak organelnya. Pemutaran homogenat ini dalam sentrifugasi akan memisahkan dua fraksi, yaitu pelet dan supernatan. Pelet terdiri dari struktur-struktur yang lebih besar dan mengumpul di bagian bawah tabung. Supernatan terdiri dari bagian-bagian sel yang lebih kecil dan tersuspensi dalam cairan di atas pelet (Miller, 2000).

- Persiapan Bahan :

- 400 mL stok khamir laut dari hasil kultur
- 200 mL kasein 0,5%: larutkan 1 gr kasein dalam 200 mL *buffer glisin NaOH 0,05 M pH 9*
  - Untuk mendapatkan berat kasein 0,5% yang dibutuhkan dalam kapasitas volume =  $\frac{0,5}{100} \times 200 = 1 \text{ gr}$
- 400 mL TCA 10% : larutkan 40 gr TCA dalam 400 mL akuades
  - Untuk mendapatkan berat TCA 10% yang dibutuhkan dalam kapasitas volume =  $\frac{10}{100} \times 400 = 40 \text{ gr}$
- Buffer glisin 0,05M : larutkan 0,0375 gr glisin dalam 100 mL akuades.
  - Perhitungan glisin 0,05 M dalam 100 mL akuades  
 $= M \times V \times BM = 0,05 \text{ M} \times 0,1 \text{ L} \times 75 = 0,375 \text{ g/ 100 mL akuades}$
- NaOH : Larutkan 0,2 gr NaOH dalam 100 mL akuades



- Perhitungan NaOH dalam 100 mL akuades
    - =  $M \times V \times BM = 0,05 \text{ M} \times 0,1 \text{ L} \times 40 = 0,2 \text{ g} / 100 \text{ mL}$  akuades
  - Kemudian dihomogenkan larutan glisin dan NaOH dan diatur pH-nya pada pH 9
- 
- Prosedur kerja:
    - *Marine yeast* sebanyak 400 mL disentrifugasi dengan kecepatan 5.000 rpm dengan suhu 4°C selama 10 menit (supernatan)
    - Supernatan(ekstrak kasar khamir laut) diambil sebanyak100 mL dan ditambahkan kasein 0,5% sebanyak 200 mL dalam glisin NaOH 0,05 M pada pH 9
    - Diinkubasi pada suhu 45°C selama 30 menit, kemudian ditambahkan TCA 10% sebanyak 400 mL
    - Disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm dengan suhu 4°C dilakukan selama 10 menit
    - Didapatkan supernatan (ekstraselular khamir laut) 700 mL

### 3.3.3 Pemurnian Enzim Kasar Protease Khamir Laut

#### a. Pengendapan dengan Amonium sulfat( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ )

pada penelitian ini digunakan garam amonium sulfat untuk pemurnian protein, karena amonium sulfat mudah didapatkan, harganya relatif murah, bersifat menstabilkan enzim serta dapat mencegah aktivitas enzim proteolitik (Yurnaliza, 2002).

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 (Duetscher, 1990). Garam yang tersisa pada endapan enzim dipisahkan dengan dialisis.

▪ Persiapan Bahan :

- Supernatan(ekstrakselular khamir laut)diambil sebanyak 100 mL
- Ammonium sulfat 40%
  - Untuk mendapatkan berat ammonium sulfat 40% dalam 100 mL dihitung dengan cara sebagai berikut =  $\frac{40}{100}$   
 $= 40 \text{ gr/ 100 mL supernatan}$

▪ Prosedur kerja:

- Supernatan (ekstrakselular khamir laut)diambil sebanyak 100 mL
- Dilarutkan dalam 40 gr ammonium sulfat dan diaduk dengan *magnetic stirrer* secara perlahansampai homogen
- Didiamkan selama 10 menit pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$
- Disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$  selama 10 menit
- Didapatkan hasil endapan berupa pelet



### b. Dialisis

Metode dialisis banyak digunakan dalam pemurnian protein (terutama enzim). Metode ini digunakan untuk menghilangkan molekul garam, seperti ammonium sulfat. Dialisis adalah proses perpindahan molekul terlarut dari suatu campuran larutan yang terjadi akibat difusi pada membran semi-permeabel. Molekul terlarut yang berukuran lebih kecil dari pori-pori membran tersebut dapat keluar, sedangkan molekul lainnya yang lebih besar akan tertahan di dalam kantung membran. Membran dialisis untuk protein mempunyai ukuran bervariasi dan yang biasa digunakan adalah ukuran 10 – 100 µm (Janson dan Ryden, 1998). Laju difusi ditentukan oleh beberapa kondisi:

- Konsentrasi molekul pelarut yang akan keluar dari kantung dialisis. Jika konsentrasi molekul terlarut di lingkungan lebih kecil dibandingkan dengan yang ada di dalam kantung dialisis maka laju difusi akan semakin cepat.
- Luas permukaan kantung dialisis. Semakin luas permukaan membran yang digunakan maka laju difusi akan semakin cepat.
- Volume pelarut. Jika rasio luas permukaan membran dengan volume pelarut besar maka laju difusi akan berlangsung dengan cepat karena molekul terlarut dapat berdifusi dalam jarak yang dekat.

#### ▪ Persiapan Bahan :

- Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 5% : sebanyak 5 gr Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> dilarutkan akuades.
  - Untuk mendapatkan berat Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 5% dalam 100 mL dihitung dengan cara sebagai berikut =  $\frac{5}{100} \times 100 = 5$  gr/ 100 mL akuades



- EDTA 50 mM pH 8 : sebanyak 1,861 gr EDTA dilarutkan dalam 100 mL akuades.
- Kantongdialis 25 kDa
  - Potong selofan sepanjang 10 cm
  - Didiikan 100 mL larutan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  5% diatas *hot plate* kemudian masukkan kantong selofan selama 15 menit, kemudian dicuci dengan akuades.
  - Didiikan 100 mL larutan EDTA 50 mM pH 9 di atas *hot plate* kemudian masukkan kantong selofan selama 15 menit, kemudian dicuci dengan akuades.
  - Didiikan akuades steril diatas hot plate kemudian masukkan kantong selofan selama 15 menit, lalu cuci dengan akuades
- Pelet hasil pengendapan dengan ammonium sulfat
- Buffer fosfat 0,1 M pH 8
  - Larutan A : 0,028392 gr  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  dilarutkan dalam 2 mL akuades  
Perhitungan  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  dalam 2 mL akuades  

$$= M \times V \times BM = 0,1 \times 0,002 \times 141,96$$

$$= 0,028392 \text{ g} / 2 \text{ mL akuades}$$
  - Larutan B : 0,143256 gr  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  dilarutkan dalam 4 mL akuades  
Perhitungan  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  dalam 4 mL akuades  

$$= M \times V \times BM = 0,1 \times 0,004 \times 358,14$$

$$= 0,143256 \text{ g} / 4 \text{ mL akuades}$$
  - Diambil larutan A (1,95 mL) dan larutan B (3,05 mL), kemudian dicek pH 8 dan ditambahkan akuades hingga 1 Liter.



- Buffer fosfat 0,05 M pH 8

➤ Larutan A = 1,41 gr Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> dilarutkan dalam 200 mL akuades.

Perhitungan Larutan A (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) dalam 200 mL akuades

$$= M \times V \times BM = 0,05 \times 0,02 \times 141,96$$

$$= 1,41 \text{ g} / 200 \text{ mL} \text{ akuades}$$

➤ Larutan B = 6,267 gr Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O dilarutkan dalam 350 mL akuades.

Perhitungan Larutan B (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O) dalam 350 mL akuades

$$= M \times V \times BM = 0,05 \times 0,35 \times 358,14$$

$$= 6,267 \text{ g} / 350 \text{ mL} \text{ akuades}$$

➤ Diambil larutan A (195 mL) dan larutan B (305 mL), dicek pH 8 kemudian ditambahkan akuades hingga 1.000 mL.

- Prosedur kerja:

- Pelet hasil pengendapan amonium sulfat ditambah 10 mL *buffer phosphate* 0,1 M pH 8
- Dimasukkan dalam kantong selofan berukuran 25 kDa, setelah dirapatkan tiap ujung dengan penjepit selofan dilakukan dialisis dalam 1L *buffer phosphate* 0,05 M pH 8 dan didiamkan selama semalam.
- Disiapkan *eppendorf* dan ditimbang terlebih dahulu
- Dimasukkan hasil dialisis dalam *eppendorf* sebanyak 0,5 mL
- Ditambahkan etanol dingin dengan perbandingan (1:1), kemudian *eppendorf* digoyang perlahan-lahan
- Didiamkan dalam refrigerator pada suhu 4°C selama ±1 jam



- Disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit
- Dikering-anginkan pelet dalam refrigerator
- Ditimbang *eppendorf* untuk mengetahui selisih bobot
- Didapatkan pelet (dialisat ekstraselular khamir laut)

### 3.3.4 Karakterisasi Dialisat Ekstraselular Khamir Laut

#### a. Penentuan Konsentrasi Protein Khamir Laut

**Metode :** (Wiseman, 1985) dan (Holme dan Peck, 1993) dengan biuret

Penentuan konsentrasi enzim dari ekstrak khamir laut menggunakan metode biuret dengan BSA sebagai standar. Prinsip kerja metode biuret adalah senyawa dengan 2 atau lebih ikatan peptida apabila direaksikan dengan garam kupri dalam suasana basa akan membentuk warna ungu. Reaksi biuret bergantung pada pembentukan suatu senyawa kompleks antara ion Cu<sup>++</sup> dengan 4 atom N-peptida pada suasana basa, maka akan membentuk suatu kompleks warna ungu yang absorbansinya dapat dibaca pada panjang gelombang 540 nm.

#### ▪ Persiapan Bahan :

- Dialisat ekstraselular khamir laut 1 mL : 2 mg dialisat ekstraselular khamir laut sebanyak 1 mg dilarutkan dalam 1.000 µL *Phosphate Buffer Saline (PBS)*
- Disiapkan PBS 1L : larutkan 2,4 gr NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 1,2 gr NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,7 gr KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6,8 gr KCl dalam 300 mL kemudian distrirer dan atur pH hingga netral kemudian ditambah akuadest 700 mL

- Reagen biuret 50 mL : larutkan 0,075 gr tembaga (II) sulfat ( $\text{CuSO}_4$ ) sebagai sumber ion  $\text{Cu}^{2+}$ , KI 0,05 gr, dan kalium natrium tartrat ( $\text{KNaC}_4\text{O}_6$ ) 0,03 gr, kalium natrium tartrat sebagai penstabil ion  $\text{Cu}^{2+}$  lalu tambahkan 15 mL NaOH 2,5 M
  - Protein standar 2 mL : larutkan standar protein BSA 1.200 ppm (1.200 mg/L), kemudian dilakukan pengenceran larutan stok
- Prosedur kerja:
- Dibuat larutan standar dengan pengenceran larutan stok. Konsentrasi standar protein BSA dan pengencerannya dapat dilihat pada Tabel 2 :

Tabel 2.Pengenceran larutan stok BSA

Larutan stok BSA ( $\mu\text{L}$ )	13	26	52	104	208	416	832
Akuades ( $\mu\text{L}$ )	987	974	948	896	792	584	168
Konsentrasi protein (( $\mu\text{g/mL}$ )	15,6	31,2	62,4	124,8	249,6	499,2	998,4

- Disiapkan tabung reaksi sebanyak 14 buah, isi masing-masing tabung reaksi dengan larutan stok BSA sesuai konsentrasi yang telah ditentukan dan ditandai dengan label, kemudian divortek
- 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  $37^{\circ}\text{C}$ , selama 20 menit dalam inkubator



- Baca serapan dengan spektrofotometer UV-VIS 1.700 pada panjang gelombang 540 nm dengan spektrofotometer dan dicatat hasilnya

### Perhitungan Konsentrasi Protein

Setelah didapat nilai serapan dari larutan BSA maka dibuat kurva standar, kemudian ditentukan persamaan  $y = ax + b$  untuk menghitung konsentrasi protein dalam sampel (ppm).

Dimana :  $y$  = absorbansi

$x$  = konsentrasi

### b. Penentuan Aktivitas Protease Khamir Laut

**Metode :** Bergmeyer (Walter, 1984)

Penentuan aktifitas 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 (II). Ion Cu<sup>+</sup> kemudian akan mereduksi Folin-phenol reagent, phosphomolibdat-phosphotungstat (*phosphomolybdotungstate*), menghasilkan heteropolymolybdenum *blue* akibat reaksi oksidasi gugus aromatik (rantai samping asam amino) terkatalis Cu, yang memberikan warna biru intensif yang dapat dideteksi secara kolorimetri. Kekuatan warna biru terutama bergantung pada kandungan residu triptofan dan tirosinnyadan dibaca pada panjang gelombang 650 nm.



- Preparasi Bahan :

- Dialisatekstraselular khamir laut 1 mL : dialisat ekstraselular khamir laut 2 mg dilarutkan dalam 1.000 µL PBS dalam eppendorf
- Reagen folin-phenol ciocalteau 6 mL : encerkan reagen dalam akuades 4 mL dengan perbandingan 1:2, kemudian vortek
- Protein standar 5 mL : larutkan standar tirosin dengan akuades pada konsentrasi 1.500 ppm (1,5 mg/mL) sebagai larutan stok tirosin
- *Buffer* glisin NaOH 0,05 M : sebanyak 0,00375 gr glisin dilarutkan dalam 1 mL akuades. Larutkan 0,002 gram NaoH dalam 1 mL akuades, kemudian campurkan larutan glisin dan NaOH.

- Perhitungan glisin dalam 1 mL akuades

$$\begin{aligned} &= M \times V \times BM \\ &= 0,05 \times 0,001 \times 75,07 \\ &= 0,00375 \text{ g/ 1 mL akuades} \end{aligned}$$

- Perhitungan NaOH dalam 1 mL akuades

$$\begin{aligned} &= M \times V \times BM \\ &= 0,05 \times 0,001 \times 40 \\ &= 0,002 \text{ g/ 1 mL akuades} \end{aligned}$$

- kemudian homogenkan larutan glisin dalam NaOH dan atur pH-nya pada pH 9, diambil 1 mL dan ditambahkan 0,005 gr kasein

- Untuk mendapatkan berat kasein 0,5% yang dibutuhkan dalam

$$\text{kapasitas volume} = \frac{0,5}{100} = 0,005 \text{ gr dilarutkan 1 mL buffer glisin-NaOH}$$

- 2 mL TCA 10% : larutkan 0,2 gr TCA dalam 2 mL akuades

- Untuk mendapatkan TCA 10% kasein dalam kapasitas volume

$$= \frac{10}{100} = 0,2 \text{ gr dilarutkan 2 mL akuades}$$



- Larutan standar : kasein 0,5% dalam glisin-NaOH sebanyak 1 mL, larutan stok tirosin 1.500 ppm sebanyak 0,5 mL, larutan TCA 10% sebanyak 2 mL dihomogenkan, setelah itu disentrifus 5.000 rpm pada suhu 4 °C selama 10 menit
  - Blanko : sebanyak 1 mL casein 0,5% dalam glisin-NaOH, 0,5 mL akuades dan 2 mL larutan TCA 10% dihomogenkan, kemudian disentrifus 5.000 rpm pada suhu 4 °C selama 10 menit
- Prosedur kerja:
- Sebanyak 0,5 mL dialisat ekstraselular khamir laut dimasukkan dalam kuvet dan ditambahkan 1 mL 0,5 kasein dalam glisin NaOH (0,05 mol/L)
  - 1,5 mg/ mL tirosin 1.500 ppm dalam 1 mL 0,5 kasein dalam *buffer* glisin NaOH untuk larutan standar
  - Inkubasi pada suhu 45°C selama 30 menit, kemudian ditambahkan TCA 10% sebanyak 2 mL yang berfungsi untuk mengendapkan protein yang tidak dibebaskan dan menghentikan reaksi.
  - Disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit. Supernatan diambil sebanyak 1 mL dan dimasukkan dalam tabung reaksi
  - Ditambah *Reagen Folin-phenol Ciocalteau* sebanyak 2 mL
  - Diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit.
  - Dibaca absorbansinya dengan spektrofotometer UV-VIS 1.700 pada panjang gelombang 650 nm.
  - Prosedur pengukuran aktivitas dapat dilihat pada Tabel3.

Tabel 3. Prosedur pengukuran aktivitas protease



Perlakuan	Volume (mL)		
	Sampel	Standar	Blanko
Kasein 0,5 % dalam glisin NaOH	1	1	1
Supernatan hasil sentrifugasi dingin dengan kecepatan 5.000 rpm pada suhu 4°C selama 10	0,5	-	-
Tirosin sebanyak 1,5 mg	-	0,5	-
Akuades	-	-	0,5
Diinkubasi 45°C selama 30 menit didalam waterbath			
Larutan TCA 10 %	2	2	2
Disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit			
Supernatan	1	1	1
Reagen Folin-phenol Ciocalteu	2	2	2
Diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit			
Larutan sampel, standar, dan blanko diambil masing-masing 1 mL			
Serapan sampel, standar, dan blanko dibaca dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 650 nm			

- Perhitungan aktivitas protease

Setelah didapatkan nilai serapan dari sampel, standar dan blanko kemudian dimasukkan dalam rumus :

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

Dimana:

- |              |                                   |
|--------------|-----------------------------------|
| U            | = aktivitas enzim protease (U/mL) |
| Abs. sampel  | = nilai serapan sampel            |
| Abs. blanko  | = nilai serapan blanko            |
| Abs. standar | = nilai serapan standar           |
| Fp           | = faktor pengenceran              |
| t inkubasi   | = lama inkubasi (menit)           |

Dihitung aktivitas spesifik enzim dengan rumus :

$$AS = \frac{U}{x}$$



Dimana :

$U$  = aktivitas spesifik enzim

$x$  = konsentrasi protein

### c. Penentuan $K_M$ dan $V_{max}$ Protease Ekstrak Khamir Laut

#### Metode :Kolorimetri

Penentuan  $K_M$  dan  $V_{max}$  ditentukan berdasarkan tetapan Michaelis–Menten (Chiet al. 2006).Prinsip kerja penentuan  $K_M$  dan  $V_{maks}$  adalah maksimal kecepatan proses enzim, dapat mendekati kecepatan  $V_{maks}$  tapi tidak akan pernah mencapainya dan Michaelis-Menten konstan, sama dengan konsentrasi di mana laju proses sama dengan setengah dari tingkat maksimum. Penentuannya menggunakan reaksi larutan Folin-phenol Ciocalteau dengan sampel dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 650 nm.

- Persiapan Bahan :

- Disiapkan 1 mL dialisat ekstraselular khamir laut : 2 mg dialisat ekstraselular khamir laut dilarutkan dalam 1.000  $\mu$ L PBS
- Pembuatan substrat ikan peperek 200 mL : 10 gr ikan peperek (beku) dithawing dan direbus pada suhu 90°C selama 20 menit dengan larutan PBS 10 mL (1:1) untuk menghentikan aktivitas biokimianya. Campuran dihancurkan dalam blender selama ± 10 menit, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 4.500 rpm pada suhu 37 °C selama 15 menit.Supernatant diencerkan dan ditambah dialisat ekstraselular khamir laut. Konsentrasi dan penambahan dialisat ekstraselular khamir laut dapat dilihat pada Tabel 4



Tabel 4.Konsentrasi substrat ikan peperek dengan pengenceran

No.	Konsentrasi Substrat (%)	Substrat Ikan Peperek (mL)	PBS (mL)	Dialisat protease khamir laut ( $\mu$ L)
1	0,5	1	2	75
2	0,25	1	4	125
3	0,16	1	6	175
4	0,125	1	8	225
5	0,1	1	10	275

- Kemudian dihidrolisis pada pH 12 suhu 50°C selama 62 menit
- Penghentian hidrolisis dilakukan pada suhu 80 °C selama 20 menit.
- Disentrifugasi dengan kecepatan 5.000 rpm selama 15 menit.

Supernatan yang didapat merupakan hidrolisat protein ikan peperek.

▪ Prosedur kerja:

(a) Penentuan V maks

- Larutan standar tirosin dan hidrolisat protein ikan peperek, masing-masing diambil sebanyak 1 mL, dan beri label kemudian tambahkan reagen folin-phenol ciocalteu dengan perbandingan 1:2
- Diinkubasi pada suhu 37 °C selama 20 menit.
- Dibaca absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 650 nm.

(b) Penentuan  $K_M$

- Larutan standar BSA dan hidrolisat protein ikan peperek, masing-masing diambil sebanyak 1 mL, dan beri label kemudian tambahkan reagen biuret dengan perbandingan 1:2
- Diinkubasi pada suhu 37 °C selama 20 menit.



- Dibaca absorbansnya dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm.
- Perhitungan  $K_M$  dan  $V_{maks}$

Konstanta Michaelis-Menten merupakan salah satu caramengkarakterisasi yaitu untuk mengukur afinitas enzim-substrat (Trenggono dan Sutaji, 2008).

- Gunakan persamaan regresi kurva linear standar tirosin untuk mendapatkan  $V$  dan persamaan regresi kurva linier standar BSA untuk mendapatkan konsentrasi substrat  $[S]$
- Tuliskan kebalikan konsentrasi substrat  $1/[S]$  dan kebalikan kecepatan reaksi  $1/v$ .
- 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. untuk mempermudah perhitungan buat Tabel sebagai berikut :

Konsentrasi (%)	$[S]$ (M)	$v$ ( $M \times \text{menit}^{-1}$ )	$1/[S]$ (M $^{-1}$ )	$1/v$ ( $M \times \text{menit}^{-1}$ )
0.5				
0.25				
0.16				
0.125				
0.1				

- $K_M$  dan  $V_{maks}$  dapat dihitung terhadap persamaan regresi linier kurva Lineweaver-Burk;

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

$$a = \frac{K_M}{V_{maks}} \quad b = \frac{1}{V_{maks}}$$

### 3.3.5 Karakterisasi Hidrolisat Protein Ikan

### a. Penentuan Derajat Hidrolisis

**Metode :**Hoyle dan Merrit (1994)

Prinsip kerja derajat hidrolisis yaitu persen banyaknya ikatan peptida yang terpecah (N) terhadap total jumlah ikatan peptide per satuan massa (N total) (Souissi *et al.* 2006). Hidrolisis menggunakan enzim akan menghasilkan peptida yang tinggi dan kurang kompleks serta mudah dipecah-pecah. Produk yang dihasilkan terhindar dari perubahan dan penghancuran produk secara hidrolitik karena enzim (Ariyani *et al.* 2003).

- Persiapan bahan:

- Disiapkan 1 mL dialisat ekstraselular khamir laut : 2 mg dialisat ekstraselular khamir laut dilarutkan dalam 1.000  $\mu$ L PBS
- Sampel hidrolisat ikan peperek : substrat ikan peperek dihidrolisis dengan menambahkan dialisat protease khamir laut 2.5%. Hidrolisis dikondisikan pada pH 12 suhu 50 °C. Hidrolisis dihentikan pada selang waktu 0, 25, 50, 75 dan 100 menit (menentukan waktu optimasi). Suhu 35, 40, 45, 50, dan 55 °C (menentukan suhu optimasi). pH 8, 9, 10, 11, dan 12 (menentukan pH optimasi). Hidrolisat dari masing-masing jenjang waktu diambil 1 mL untuk analisa N total.
- Hidrolisat protein ikan dengan masing-masing perlakuan diambil sebanyak 1 mL dan dimasukkan dalam kuvet. Kemudian ditambahkan 20% TCA sebanyak 2 mL untuk menghasilkan 10% TCA nitrogen terlarut dan 10% TCA nitrogen tidak larut. Disentrifus dengan kecepatan 5.000 rpm selama 15 menit (Sathivel *et al.* 2005; Souissi *et al.* 2006).



- Larutan KNa tartrat : larutkan KNa tatrat 500 gram dalam 1 L akuades yang dipanaskan. Sesudah dingin 50 mL pereaksi nestler. Biarkan selama 2 hari kemudian disaring.
- Larutan Nestler : 5 gram KI dalam air + HgCl dalam air (1:20) sampai terjadi endapan merah yang tidak hilang, saring dengan *glass wool* + 15 gram NaOH dalam 30 mL akuades , kemudian ditambahkan akuades sampai 100 mL, dan ditunggu sampai mengendap.

- Prosedur Kerja

- Hidrolisat protein ikan sebanyak 1 mL (untuk N total), hidrolisat protein ikan ditambahkan TCA 20 % sebanyak 20 mL kemudian disentrifus 5000 rpm, suhu 4 °C selama 10 menit. Supernatan yang didapat dianalisa N terlarut.
- Dimasukkan dalam labu Kjeldahl.
- Ditambahkan 1 gr tablet Kjeldahl, 10 mL  $H_2SO_4$  dan 2 butir batu didih kemudian dihomogenkan.
- Dipanaskan pada alat destruksi ( $\pm$  1 jam) sampai warna hijau jernih, kemudian didinginkan.
- Didinginkan dalam air, disaring, dan dihomogenkan dengan cara dikocok.
- Diambil sebanyak 5 mL, kemudian ditambahkan 0,5 mL larutan KNa tartrat, 0,5 mL larutan Nestler, dan 5 mL akuades.
- Dihomogenkan dan didiamkan selama 10 menit.
- Dibaca serapannya pada panjang gelombang 490 nm.



- Perhitungan DH :

DH dihitung dengan rumus:

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

Kemudian dibuat kurva polinominal yang menyatakan hubungan antara DH (sumbu x) dan waktu, pH, suhu (sumbu y).

### b. Analisis Berat Molekul Protein Hidrolisat Ikan Peperek

**Metode :** SDS PAGE (Aulanni'am, 2005)

Berat molekul protein pada hidrolisat ikan peperek dapat ditentukan dengan menggunakan metode SDS-PAGE (*Sodium Deodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Electrophoresis*). SDS-PAGE adalah teknik elektroforesis gel yang menggunakan poliakrilamida untuk memisahkan protein yang bermuatan berdasarkan berat molekulnya. Sodium Dodesil Sulfat (SDS) merupakan deterjen ionik yang dapat melarutkan molekul hidrofobik yang memberikan muatan negatif pada keseluruhan struktur protein. Cara kerja SDS-PAGE adalah dengan menghambat interaksi hidrofobik dan merusak ikatan hidrogen.

Metode ini diawali dengan mempersiapkan sampel untuk membuat sampel bermuatan sama sehingga muatan tidak mempengaruhi pergerakan komponen sampel dalam gel. Persiapan dilakukan dengan cara mendenaturasi protein menggunakan SDS dan memutus ikatan disulfida pada struktur protein menggunakan beta-merkaptoetanol. Selanjutnya gel poliakrilamida dibuat menggunakan cetakan gel membentuk lembaran segiempat dengan ketebalan tertentu. Setelah sampel dimasukkan dalam sumur gel, gel dialiri arus listrik sehingga komponen yang terdapat dalam sampel akan terpisah melewati matriks gel berdasarkan berat molekulnya. Untuk melihat pita komponen yang terbentuk,



gel diwarnai *Coomassie Brilliant Blue* yang berfungsi untuk mengikat protein secara spesifik dengan ikatan kovalen (Davis Let al.1994)

▪ Persiapan Bahan

- Dialisat ekstraselular khamir laut : sebanyak 1 mg dialisat ekstraselular khamir laut dilarutkan dalam 500 µL PBS.
- Ikan peperek : 100 gram ikan peperek ditambahkan PBS sebanyak 100 mL, direbus pada suhu 90°C selama 20 menit, disentrifus 4.500 rpm, suhu 37°C selama 15 menit.
- Hidrolisat protein ikan : 50 gram ikan peperek ditambahkan 50 mL PBS direbus pada suhu 90°C selama 20 menit kemudian diblender dan disentrifus 4.500 rpm pada suhu 37°C selama 15 menit kemudian diencerkan dengan berbagai konsentrasi dan ditambahkan dialisat ekstraselular khamir laut, kemudian dihidrolisis pada pH 12 suhu 50°C selama 62 menit. Penghentian hidrolisis dilakukan pada suhu 80°C selama 20 menit. Disentrifus 5.000 rpm selama 15 menit. Supernatan yang didapat merupakan hidrolisat ikan peperek.
- Bahan dalam pembuatan sumur gel meliputi pembuatan *separating gel* (12,5%) dan stacking gel (12,5%). Komposisi pembuatannya dapat dilihat pada Tabel 5 dan 6.

Tabel 5.Gel pemisah (*separating gel*) (12,5%) terdiri dari :

Komposisi	1 slab (µL)
Acrylamide 30%	515
Tris HCL 1.5 M, pH 8.8	625
H <sub>2</sub> O	1325
SDS 10%	25
APS 10%	7,5
TEMED	5



Tabel 6.Gel pengumpul (*stacking gel*) (12,5%) terdiri dari :

Komposisi	1 slab ( $\mu$ L)
Acrylamide 30%	4126
Tris HCL 1.5 M, pH 8.8	2500
H <sub>2</sub> O	3270
SDS 10%	100
APS 10%	100
TEMED	20

- RSB (*Reducing Sample Buffer*) : 1 mL Tris Cl pH 9 + 0,8 mL Gliserol + 1,6 mL SDS 10% + 0,4 Mercaptoetanol + 0,2 mL *Bromophenol blue* kemudian ditambahkan 0,8 mL akuades dan dihomogenkan.
- Larutan *destaining*: 20 mL Metanol 20% + 10 mL asam asetat glasial 10%, kemudian ditambahkan akuades sampai volume 100 mL dan dihomogenkan.
- Larutan *staining*: 0,1 gram *Coomassie blue R* 0,1% + 40 mL metanol 40% + 10 mL asam asetat glasial 10% kemudian ditambah akuades sampai volume 100 mL dan dihomogenkan.
- *Runningbuffer*: 3,03 gram Tris Base + 14,2 gram glisin dilarutkan dalam 700 mL akuades kemudian dicek pH 12. Setelah itu ditambah 1 gram SDS, dihomogenkan dan ditambah akuades sampai volumenya 1L.
  
- Prosedur kerja:
  - Dimasukkan masing-masing sampel dan marker kedalam sumuran gel SDS-PAGE sebanyak 15 $\mu$ L dengan mikropipet
  - Hubungkan *chamber* elektroforesis dengan arus listrik dan running sampel pada arus 20 Ampere dan voltase 120 V selama 75 menit, running sampel adalah proses pemisahan protein, kemudian protein



akan bergerak dari elektroda negatif ke elektroda positif sampai pada jarak berat molekulnya. Running sampel selesai ketika warna pelacak atau *tracking dye* mencapai jarak 0,5 cm dari dasar gel atau ± 75 menit.

- Proses elektroforesis dilakukan sampai pita mencapai batas akhir dari gel
- Pewarnaan dilakukan dengan merendam gel dalam *staining solution* sambil digoyang dengan *shaker* selama 1-2 jam.
- Selanjutnya penghilangan warna (*destaining*) dilakukan dengan merendam gel dalam *destaining solution*. Proses *destaining* dilakukan sampai pita protein pada gel terlihat dan warna gel tidak terlalu biru. Untuk menghilangkan warna latar belakang.
- Pita protein akan nampak dalam gel.

- Perhitungan

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

### c. Analisis Profil Asam Amino Ikan Peperek

#### **Metode : HPLC**

Prinsip kerja analisa profil asam amino dengan HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) yaitu klorida (5-dimetilamino-1-naftalen sulfonil klorida) untuk derivatisasi asam-asam amino, menjadi derivat dansil yang bersifat fluoresen, lalu dipisahkan dengan prosedur kromatografi kolom fase terbalik (*reversed phase column chromatography*). Hasil yang diperoleh dideteksi dan diukur dengan detektor fluoresen.



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 detektor serta integrator akan mendapatkan kromatogram. Kromatogram memuat waktu dan tinggi puncak suatu senyawa. Alat yang digunakan dalam menganalisa profil asam amino adalah HPLC.

Kolom	: Licrospher 100 RP 18 (15 µm) panjang kolom 125 mL x 4 mm
Fase gerak	: A = CH <sub>3</sub> OH : 50mM natrium asetat : THF (2 :96 :2) pH 6,8 B = 65% CH <sub>3</sub> OH
Kecepatan aliran	: 1 mL/menit
Detektor	: Flouresen Shimadzu RF-138  X Wavelength : 360 EM Wavelength : 460

Tabel 7. Gradien Eluen

Waktu (menit)	Pompa (A) %	Pompa (B) %
0,1	100	0
45	0	100
50 berhenti	-	-

▪ Persiapan bahan:

- Sampel hidrolisat ikan peperek : substrat ikan peperek sebanyak 12 mL dihidrolisis menggunakan dialisat khamir laut selama 83 menit pada suhu 49°C dan pH 8,4, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5.000 rpm suhu 4°C selama 15 menit dalam eppendorf 1,5 mL dan diambil supernatannya.



- Hidrolisat protein ikan 60 mg ditambahkan 4 mL HCl 6 N dipanaskan selama 24 jam dengan suhu 110 °C, kemudian dinetralkan pH 7 menggunakan NaOH 6 N dan disaring menggunakan kertas saring Whatman 0,2 µm diambil filtratnya.
  - Borat : dilarutkan 3,092 gr asam borat dalam 100 mL akuabides dan ditambahkan Na borat sampai pH 9,1
  - Larutan OPA (o-ftatalaldehid) = sebanyak 0,01 gr OPA dilarutkan dalam borat sebanyak 4 mL kemudian ditambahkan 1 mL metanol dan 30 µL merkaptoetanol (1-2 tetes) dan dihomogenkan.
- Prosedur Kerja :
- Sampel ikan peperek dan hidrolisat protein ikan masing-masing diambil sebanyak 25 µL.
  - Ditambahkan larutan OPA sebanyak 300 µL kemudian dihomogenkan dengan vorteks selama 5 menit.
  - Kemudian diinjeksikan ke dalam injektor HPLC sebanyak 20 µL.
  - Didapatkan kromatogram, kemudian dianalisis.

### **Skor Asam Amino Esensial**

Skor asam amino atau *Chemical score* merupakan suatu cara penilaian kualitas protein yang berdasarkan pada analisis bahan-bahan makanan. Skor asam-asam amino membandingkan kandungan asam-asam amino esensial dalam protein suatu bahan makanan atau dalam suatu campuran protein dengan asam-asam amino esensial dalam standar protein yang ditentukan oleh FAO/WHO dan NRC.

Perhitungan skor asam amino esensial dengan dibandingkan pada standar pangan dan pakan sebagai berikut :

$$\text{Berdasarkan NRC (pakan)} = \frac{\text{Kandungan Asam Amino (gr/100 gr)}}{\text{Kandungan Asam Amino Standar NRC}}$$

$$\text{Berdasarkan FAO (pangan)} = \frac{\text{Kandungan Asam Amino (gr/100 gr)}}{\text{Kandungan Asam Amino Standar FAO}}$$

Skor asam amino esensial berdasarkan NRC dan FAO dapat dilihat pada tabel 8.

Tabel 8. Skor asam amino esensial berdasarkan NRC dan FAO.

Profil Asam Amino	Skor Asam Amino Esensial	
	NRC*	FAO**
Histidin	2.1	2,0
Arginin	4.3	5
Metionin	3.1	3.5
Valin	3.6	5.0
Fenilalanin	6.5	4.29
Isoleusin	2.5	4.0
Leusin	3.3	7.0
Lisin	5.7	5.5
Threonin	3.9	4.0
Triptofan	0.8	1.21

\* NRC (1993) merupakan referensi kebutuhan asam amino esensial untuk pakan

\*\* FAO/WHO (1985) merupakan referensi kebutuhan asam amino esensial bagi pangan

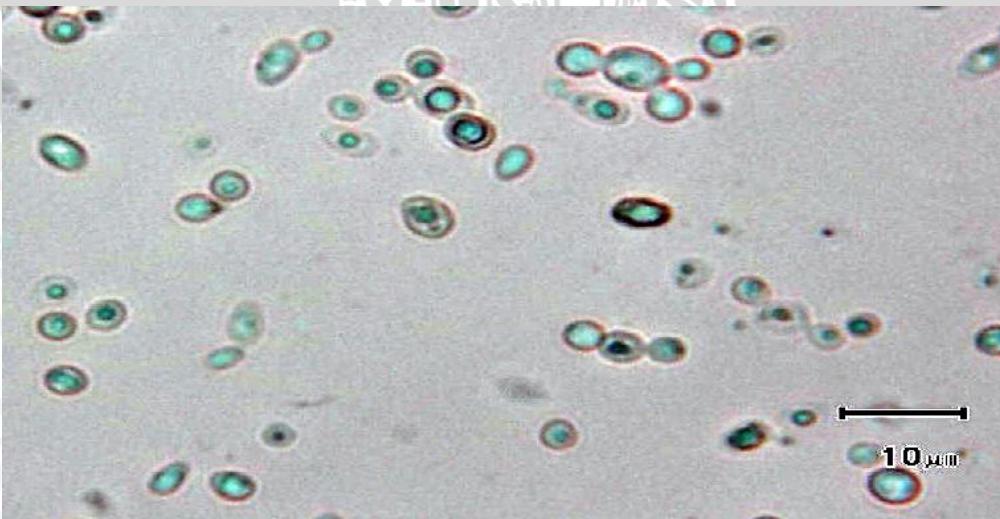


## BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Sel Khamir Laut

Menurut Volk dan Wheeler (1988), khamir mampu berkembang biak dengan cepat jika kebutuhan nutrisi dan kondisi lainnya memenuhi kebutuhannya, seperti pH dan suhu. Selain itu media tempat pertumbuhan, kandungan nutrien substrat, tersedianya oksigen, ada tidaknya senyawa penghambat juga mempunyai pengaruh dalam perkembangan sel khamir laut (Frazier dan Westhoff, 1988).

Menurut Hadioetomo(1985), morfologi sel khamir dapat diamati menggunakan beberapa cara yaitu: pengamatan langsung dengan mikroskop biasa dan pengamatan dengan mikroskop elektron. Sel khamir laut yang telah dikultur dan dilakukan perbesaran 400 kali dengan mikroskop, hasilnya terlihat padagambar 1.



Gambar 1. Sel khamir laut

Gambar 1 memperlihatkan bahwa khamir laut mempunyai bentuk bundar dan oval. Sel khamir mempunyai ukuran yang bervariasi, yaitu dengan panjang 1-5 mikrometer sampai 20 mikrometer, dan lebar 1-10 mikrometer. Bentuk sel khamir bermacam-macam yaitu bulat, oval, silinder atau batang, segitiga melengkung, berbentuk botol, bentuk apikulat, membentuk pseudomiselium dan sebagainya (Fardiaz, 1992).

Dalam kultur yang sama, ukuran dan bentuk sel khamir mungkin berbeda karena pengaruh umur sel dan kondisi lingkungan selama pertumbuhan. Sel yang muda mungkin berbeda bentuknya dari yang tua karena adanya proses ontogeni, yaitu perkembangan individu sel. Sebagai contoh, khamir yang berbentuk pada umumnya berasal dari tunas berbentuk bulat sampai oval yang terlepas dari induknya, kemudian tumbuh dan membentuk tunas sendiri. Karena proses pertunasannya bersifat bipolar, sel muda yang berbentuk oval membentuk tunas pada kedua ujungnya sehingga mempunyai bentuk apikulat. Sel-sel yang sudah tua dan telah mengalami pertunasan beberapa kali, mungkin mempunyai bentuk yang berbeda-beda. (Fardiaz, 1992).

#### 4.2 Karakteristik Dialisat Khamir Laut

Karakteristik dialisat khamir laut meliputi konsentrasi protein meliputi aktivitas enzim, konstanta Michaelis-Menten ( $K_M$ ) dan kecepatan maksimal ( $V_{maks}$ ). Data perbandingan karakteristik ekstrak kasar dengan dialisat ekstraselular khamir laut dilihat pada Tabel 9.



Tabel 9.Karakteristik ekstrak kasar khamir laut dan dialisat khamir laut

Karakteristik	Ekstrak kasar Khamir Laut	Dialisat Khamir Laut
Konsentrasi Protein (mg/ mL)	2,2175	70,5
Aktivitas Enzim (mU/mL/menit)	21,5	67
Kinetika enzim		
- Kecepatan maks ( $V_{maks}$ ) (mmol/min/mg)	15,405	8,423
- konstanta Michaelis-Menten ( $K_M$ ) (mM)	$2,772 \times 10^3$	$2,241 \times 10^3$

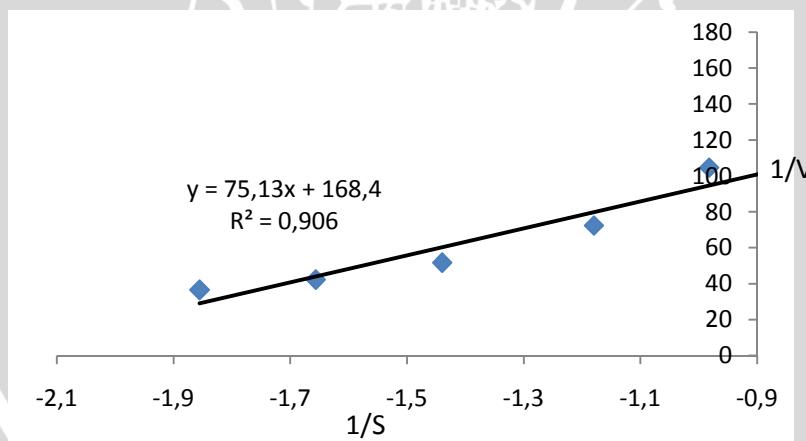
Tabel 9 memperlihatkan bahwa konsentrasi protein dialisat ekstraseluler khamir laut tersebut lebih tinggi dibandingkan dengan konsentrasi ekstrak kasar khamir laut sebesar 2,2175 mg/mL (Ahmad, 2010). Hal ini disebabkan karena dialisat ekstraseluler khamir laut telah mengalami pemekatan. Sebagaimana yang telah dijelaskan oleh Schmidt *et al.* (2007) bahwa kantong selofan dengan *molecular weight cutoff* (MWCO) 25 kDa dapat digunakan untuk menghilangkan ion nitrogen, asam amino, atau peptida yang berukuran kecil. Menurut Sindumarta dan Natalia, (1999) protease merupakan protein yang memiliki berat molekul lebih besar dari 12 kDa, sehingga protein (non enzim) dan kontaminan yang mempunyai ukuran < 25 kDa ikut keluar dari kantong selofan. Hal tersebut dapat menyebabkan konsentrasi protein dialisat enzim menjadi lebih pekat.

Tabel 9 menunjukkan bahwa aktivitas enzim dialisat lebih tinggi dibandingkan aktivitasnya pada ekstrak kasar khamir laut sebesar 21,5 mU/menit/mL (Ahmad, 2010). Tingginya nilai aktivitas protease dialisat ekstraselular khamir laut tersebut disebabkan telah mengalami pemekatan. Pemekatan tersebut bertujuan untuk memisahkan enzim dari pengotor komponen lain guna untuk menghilangkan senyawa lain yang dapat mengganggu sisi aktif enzim (Othmer, 1987).



Tabel 9 juga memperlihatkan bahwa nilai tersebut masih lebih kecil apabila dibandingnilai aktivitas protease ekstrak murni khamir laut *Aurobasidium pullulans* strain 10 yang telah diisolasi dari sedimen pantai di Qingdao, Chinayang memiliki nilai aktivitas protease sebesar 623,1 U/mg; 7,2 U/mL (Ma et al.2007).Hal tersebut terjadi karena jumlah kontaminan dalam dialisat ekstraselular khamir laut masih tinggi, sehingga menghalangi sisi aktif enzim untuk berikatan dengan substrat (Kiswanto,2004).

Kinetika enzim dipengaruhi oleh laju reaksi enzimatik.Faktor-faktor penting yang mempengaruhi laju reaksi enzimatik adalah konsentrasi substrat dan enzim, demikian pula faktor-faktor lain seperti pH, suhu dan ada tidaknya kofaktor dan ion logam.Kinetika enzim ekstraselular khamir laut meliputi  $K_m$  dan  $V_{maks}$  pada kurva Lineweaver – Burk dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Kurva Lineweaver – Burk dialisat ekstraselular khamir laut

Tabel9dan Gambar 2 memperlihatkan bahwa kecepatan reaksi maksimum ( $V_{maks}$ )dialisat ekstrakselular khamir laut lebih kecil dibandingkan dengan ekstrak kasar khamir laut yang memiliki nilai sebesar 15,4 mmol/menit/mg (Ahmad, 2010). Begitu pula nilai Konstanta Michaelis-Menten

( $K_M$ ) dialisat ekstraselular khamir laut tersebut juga masih rendah jika dibandingkan dengan  $K_M$  ekstrak kasar khamir laut sebesar  $2,77 \times 10^3$  mM (Ahmad, 2010). Hal ini disebabkan protease ekstrak khamir laut tersebut telah mengalami pemurnian, sehingga dialisat ekstraselular khamir laut tersebut bebas dari kontaminan yang dapat mengganggu kerja enzim dalam mengikat substrat, dimana pada sisi aktif enzim tidak terjadi hambatan oleh kontaminan. Menurut Natalia dan Sindumarta (1999), sisi aktif enzim seringkali berupa suatu kantong atau celah yang dikelilingi rantai samping asam amino untuk mengikat substrat dan rantai samping yang berperan sebagai katalis.

Akan tetapi nilai dialisat khamir laut tersebut lebih besar dibandingkan dengan penelitian Ma et al. (2007) yang telah 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  $V_{\text{maks}}$  sebesar 0,25 mg/ml dan 0,0286  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ . nilai dialisat khamir laut tersebut lebih besar disebabkan perbedaan metode pemurnian yang dilakukan sehingga kemampuan dalam menyeleksi enzim yang dilakukan pun juga berbeda.

#### **4.3 Hidrolisis Dialisat Ekstraselular Khamir Laut pada Protein Ikan Peperek**

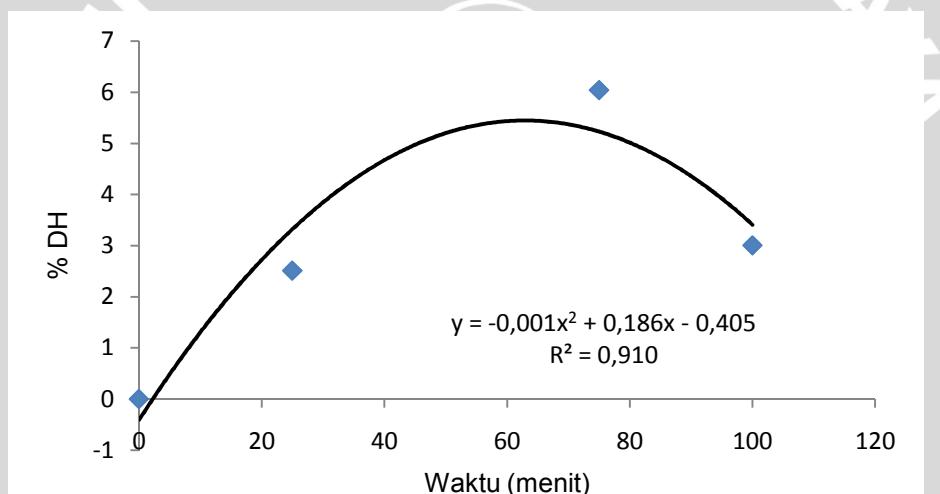
Hidrolisat protein ikan adalah produk cairan yang dibuat dari protein ikan dengan penambahan enzim proteolitik untuk mempercepat proses hidrolisis dalam kondisi terkontrol dengan hasil akhir berupa campuran komponen protein(Pigott dan Tucker, 1990).Kapasitas hidrolisis dialisat ekstraselular khamir laut pada protein ikan peperek meliputi derajat hidrolisis yang meliputi perlakuan

waktu, pH dan suhu, analisis berat molekul (SDS-PAGE), profil asam amino dengan menggunakan HPLC dan skor asam amino.

#### 4.3.1 Derajat Hidrolisis (DH)

##### 4.3.1.1 Waktu

Pengaruh waktu hidrolisis dialisat ekstraselular khamir laut terhadap derajat hidrolisis pada ikan peperek. Persentase derajat hidrolisis dialisat ekstraselular khamir laut dapat dilihat pada Gambar 3.



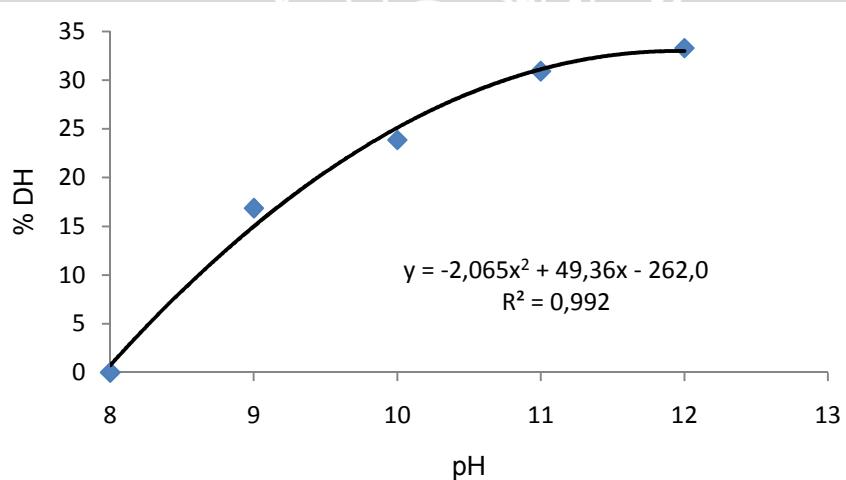
Gambar 3. Persentase derajat hidrolisis dialisat ekstraselular khamir laut pada ikan peperek dalam berbagai waktu hidrolisis

Gambar 3 menunjukkan bahwa derajat hidrolisis dialisat ekstraselular khamir laut pada ikan peperek optimasinya terjadi pada menit ke 62 dengan persentase sebesar 6,6%. Waktu optimasi tersebut lebih cepat dibanding waktu optimasi hidrolisis ekstraselular khamir laut dalam menghidrolisis ikan peperek yaitu 84,5 menit dengan derajat hidrolisis sebesar 6 % (Ahmad 2010). Lebih cepatnya waktu optimasi tersebut disebabkan bahwa pada menit ke 62 konformasi tiga dimensi dialisat ekstraseluler khamir laut dalam keadaan yang

kondusif, sisi aktifnya mampu berinteraksi dengan protein ikan peperek secara optimal (aktivitas tinggi). Interaksi enzim dan substrat ini akan membentuk ikatan kompleks enzim substrat, dimana interaksi tersebut akan menghasilkan produk(Rao,1998). Winarno (1995) menambahkan bahwa peningkatan waktu inkubasi akan meningkatkan kesempatan enzim untuk memecah substrat sehingga hasil hidrolisis semakin meningkat. Wirahadikusuma (1989) menambahkan bahwa kecepatan reaksi berbanding terbalik lurus dengan waktu kontak enzim dengan substrat.

#### 4.3.1.2 pH

Pengaruh pH hidrolisis dialisat ekstraselular khamir laut terhadap derajat hidrolisis pada ikan peperek. Persentase derajat hidrolisis dialisat ekstraselular khamir laut dapat dilihat pada Gambar 4.

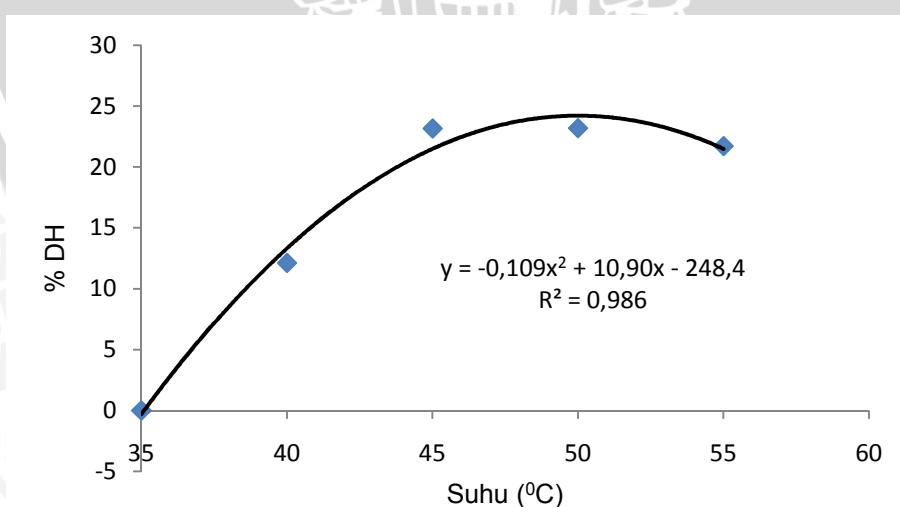


Gambar 4.Persentase derajat hidrolisis dialisat ekstraselular khamir laut pada ikan peperek dalam berbagai pH hidrolisis

Gambar 4menunjukkan bahwa persentase derajat hidrolisis dialisat ekstraselular khamir laut pada ikan peperek optimasinya terjadi pada pH 12 dengan persentase sebesar 15 %.pHtersebut lebihtinggi atau terlihat lebihbasa bila dibandingkan dengan ekstraselular khamir laut dalam menghidrolisis ikan peperek pada pH 9 dengan derajat hidrolisis sebesar 6 % (Ahmad, 2010).Berarti pada pH alkali protease yang terkandung dalam dialisat ekstraselular khamir laut tersebut dapat berinteraksi secara optimal dengan protein ikan peperek. Protease alkali didapatkan aktif pada pH antara 8-13 dan banyak yang termasuk ke dalam golongan protease serin subtilisin(Suhartono, 2000). Konformasi enzim dalam keadaan kondusif, sehingga sisi aktifnya mampu berinteraksi dengan protein ikan peperek secara optimal (aktivitas tinggi) (Rao,1998).

#### 4.3.1.3 Suhu

Pengaruh suhu hidrolisis dialisat ekstraselular khamir laut terhadap derajat hidrolisis pada ikan peperek.Persentase derajat hidrolisis dialisat ekstraselular khamir laut dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5.Persentase derajat hidrolisis dialisat ekstraselular khamir laut pada ikan peperek dalam berbagai suhu hidrolisis

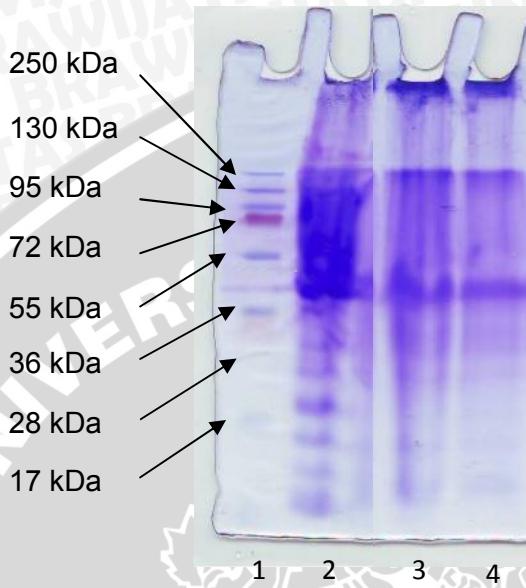
Gambar 5 diatas menunjukkan bahwa suhu optimasi dialisat ekstraselular khamir laut dalam menghidrolisis protein ikan peperek yaitu pada suhu 50°C dengan derajat hidrolisis sebesar 24 %. Suhu tersebut lebih tinggi dibanding suhu optimasi ekstraselular khamir laut dalam menghidrolisis ikan peperek, yaitu pada suhu 45 °C dengan derajat hidrolisis sebesar 6% (Ahmad, 2010). Suhu yang lebih tinggi tersebut menunjukkan bahwa pada suhu 50 °C energi kinetik molekul dialisat khamir laut mengalami peningkatan, sehingga peluang terjadinya tumbukan antara molekul dialisat khamir laut dan protein ikan peperek semakin besar. Hal ini sesuai dengan pernyataan Pelczar dan Chan (1989) bahwa aktivitas enzim bertambah dengan naiknya suhu sampai mencapai aktivitas optimum, kemudian kenaikan suhu lebih lanjut berakibat dengan berkurangnya aktivitas enzim.

Suhartono (1989), menyatakan bahwa dengan bertambahnya suhu, terjadi kenaikan kecepatan reaksi enzim karena bertambahnya energi kinetik yang mempercepat gerak vibrasi, translasi dan rotasi enzim terhadap substrat, sehingga memperbesar peluang enzim dan substrat untuk bereaksi. Pada suhu yang lebih besar protein enzim mengalami perubahan konformasi yang bersifat determinan. Pada suhu tinggi, substrat juga mengalami perubahan konformasi sehingga gugus reaktifnya tidak dapat lagi atau mengalami hambatan dalam memasuki sisi aktif enzim.

#### 4.3.2 Berat Molekul Hidrolisat Protein Ikan

Penentuan berat molekul ditentukan melalui metode SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electroforesis*). Prinsip analisis SDS-PAGE adalah pemisahan protein berdasarkan berat molekul. Profil pita peptida ikan

peperek dan hidrolisat protein ikan peperek yang dihidrolisis dengan dialisat ekstraselular khamir laut dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Profil Pita Peptida

- Keterangan:
1. *Marker prestained protein ladder*
  2. Ikan peperek
  3. HPI peperek hasil hidrolisis dialisat tanpa pengenceran
  4. HPIpeperek hasil hidrolisis dialisat dengan pengenceran

Gambar 6 memperlihatkan bahwa pita peptida ikan peperek lebih tebal dibandingkan dengan hidrolisat protein ikan peperek yang dihidrolisis dengan dialisat ekstraselular khamir laut (baik dengan atau tanpa pengenceran), ada beberapa pita peptida yang tidak muncul pada sampel ikan peperek, namun muncul pada hidrolisat protein ikan (dengan atau tanpa pengenceran). Hal ini menunjukkan bahwa dialisat ekstraselular khamir laut mampu menghidrolisis protein ikan peperek. Hal ini menunjukkan bahwa dialisat ekstraselular khamir laut mampu menghidrolisis protein ikan peperek sehingga mampu memecah ikatan peptida menjadi peptida yang memiliki berat molekul lebih rendah dan pita yang

dihasilkan juga lebih tipis. Protease adalah enzim yang memiliki daya katalitik yang spesifik dan efisien terhadap ikatan peptida dari suatu molekul polipeptida atau protein. Protease memiliki variasi pemilihan substrat yang lebih luas atau berbeda dalam hal aktivitasnya terhadap ikatan-ikatan peptida protein. (Mathews and Holde, 1990). Enzim menghidrolisis protein dan memperkecil ukuran peptida, yang dapat merubah karakteristik dan meningkatkan kualitas protein (Petersen, 1981).

Menurut Jaziri (2010), khamir laut mampu menghidrolisis ikan peperek dengan cara memecah ikatan peptida, hal ini ditandai dengan munculnya pita peptida hidrolisat protein ikan peperek yang lebih tipis dan berat molekul lebih kecil daripada ikan peperek. Ditambahkan Aunstrup (1979), enzim ekstraselular mampu mendegradasi substrat dengan berat molekul tinggi menjadi berat molekul kecil. Berat molekul pita peptida ikan peperek dan hidrolisat protein ikan peperek yang dihidrolisis dengan dialisat ekstraselular khamir laut dapat dilihat pada Tabel 10.

Tabel 10. Berat Molekul (kDa) pita peptida ikan peperek dan hidrolisat protein ikan peperek yang dihidrolisis dengan dialisat ekstraselular khamir laut

Ikan Peperek	HPI tanpa Pengenceran	HPI dengan Pengenceran
157,1036	157,1036	157,1036
125.6679	-	-
108.2887	-	-
93,31293	-	-
59.70602	-	-
41.15428	41,15428	41,15428
32.91949	-	-
-	22,69081	22,69081
-	15,64037	15,64037
9,289719	-	9,289719
-	7,430888	7,430888
-	-	-
-	4,097092	4,097092
8 pita peptida	6 pita peptida	7 pita peptida



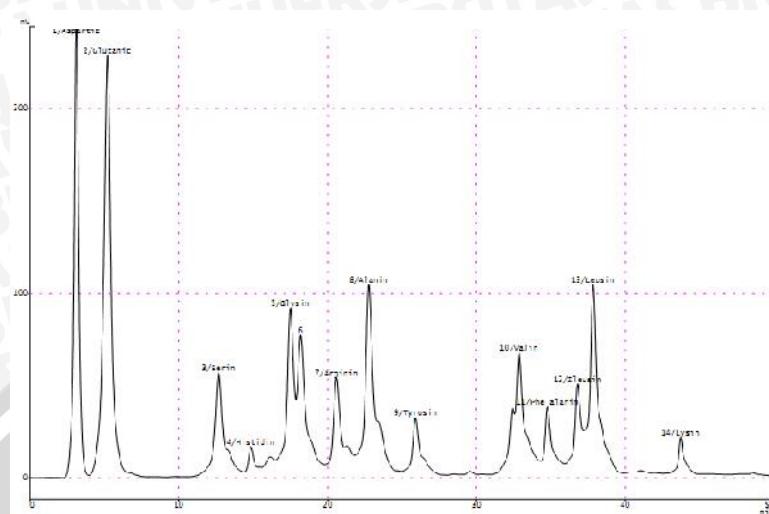
Pita peptida hidrolisat protein ikan peperek yang dihidrolisis dengan dialisat ekstraselular khamir laut lebih banyak dibandingkan dengan hidrolisat protein ikan peperek yang dihidrolisis dengan ekstraselular khamir laut yaitu dengan 5 pita protein pada berat molekul 47,62977248; 35,95818004; 24,20919152; 17,71474697; 15,15347676 kDa (Ahmad, 2010). Hal ini dimungkinkan karena protease yang terkandung dalam dialisat ekstraselular khamir laut bersifat spesifik, sisi aktifnya bekerja secara spesifik dan mampu menghidrolisis protein ikan peperek yang lebih banyak. Keaktifan protease ini disebabkan karena adanya dua gugus karboksil pada sisi aktifnya dan menunjukkan aktivitas proteasenya dengan menghidrolisis bagian internal ikatan peptida pada molekul protein dan tidak mempengaruhi gugus yang terletak diujung molekul (gugus amino dan gugus karboksil) (Rao *et al.* 1998).

#### 4.3.3 Asam Amino Hidrolisat Protein Ikan

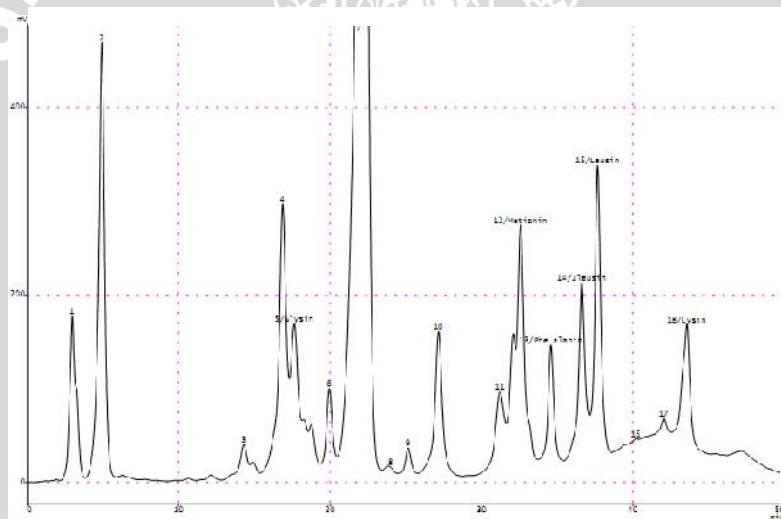
Profil asam amino ditentukan berdasarkan perbedaan afinitas molekul protein terhadap zat padat tertentu. Cairan yang akan dipisahkan merupakan fase cair dan zat padatnya merupakan fase diam (stasioner). Dengan bantuan detektor serta integrator akan mendapatkan kromatogram. Kromatogram memuat waktu dan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

Kromatogram profil asam aminoikan peperek dan hidrolisat protein ikan peperek menggunakan uji HPLC. Hasil uji asam amino ikan peperek dan hidrolisat ikan peperek dapat dilihat pada kromatogram asam amino ikan peperek pada Gambar 7 dan 8.





Gambar 7. Kromatogram Profil Asam Amino Ikan Peperek



Gambar 8. Kromatogram Asam Amino Hidrolisat Protein Ikan Peperek

Gambar 7 memperlihatkan bahwa asam amino yang terkandung dalam ikan peperek berupa aspartat, glutamat, serin, histidin, glisin, arginin, alanin, tirosin, valin, fenilalanin, isoleusin, leusin, lisin. Gambar 8 juga memperlihatkan bahwa asam amino yang terkandung dalam ikan peperek yang dihidrolisis dengan dialisat ekstraseluler khamir laut adalah glisin, metionin, fenilalanin, ileusin, leusin dan lisin. Hidrolisat yang sempurna akan menghasilkan 18-20 jenis

asam amino (Lahl dan Braun, 1994). Kandungan (gr/100 gr) asam amino Ikan peperek dan hidrolisat protein ikan peperek dapat dilihat pada Tabel 11.

Tabel 11. Kandungan Asam Amino Ikan Peperek dan HPI (ikan peperek yang dihidrolisis dengan dialisat ekstraselular khamir laut dan ikan peperek yang dihidrolisis dengan starter khamir laut mix)

Profil Asam Amino	Ikan peperek	Kandungan (gr/100 gr)	
		a	b
Aspartat	123,6154	-	0,01318
Glutamat	149,1728	-	0,01707
Serin	41,53745	-	0,00336
Histidin	12,82875	-	0,00237
Glisin	43,33334	14.672	0,00814
Arginin	64,33603	-	0,00385
Alanin	66,26409	-	0,01024
Tirosin	55,86192	-	0,00226
Valin	80,71494	-	0,00629
Fenilalanin	28,18096	8.05	0,01413
Isoleusin	23,54141	9.492	0,00535
Leusin	92,33769	20.552	0,00882
Lisin	57.49761	59.64	0,01020
Metionin	-	19.418	0,00002
Jumlah	13 asam amino	6 asam amino	14 asam amino

Keterangan :

- (a) ikan peperek yang dihidrolisis dengan dialisat ekstraselular khamir laut
- (b) ikan peperek yang dihidrolisis dengan starter khamir laut *mix* (Faharudin, 2002)

Tabel 11 memperlihatkan bahwa ikan peperek mengandung 13 jenis asam amino, hidrolisat protein ikan peperek yang dihidrolisis dengan dialisat ekstraselular khamir laut mengandung 6 jenis asam amino dan hidrolisat protein ikan peperek yang dihidrolisis dengan starter khamir laut *mix* mengandung 14 jenis asam amino. Konsentrasi kandungan asam amino ikan peperek yang dihidrolisis dengan dialisat ekstraselular khamir laut lebih rendah bila dibandingkan dengan ikan peperek. Hal ini dimungkinkan protease yang terkandung dalam dialisat ekstraselular khamir laut dalam menghidrolisis ikan

peperek bekerja lebih spesifik dan cenderung seperti alkalin protease karena memiliki pH optimum 12. Protease alkali aktif pada pH antara 8-13 dan banyak yang termasuk ke dalam golongan protease serin subtilisin, yang memotong sisi karboksil dari tirosin, fenilalanin dan leusin (Suhartono, 2000).

#### 4.3.4 Skor Asam Amino Esensial Hidrolisat Protein Ikan

Skor asam amino esensial ikan peperek yang dihidrolisis dengan dialisat ekstraselular khamir laut dan ikan peperek yang dihidrolisis dengan ekstraselular khamir laut (Ahmad, 2010) dapat dilihat pada Tabel 12.

Tabel 12. Skor asam amino esensial HPI

No.	Profil Asam Amino	Skor Asam Amino			
		NRC		FAO	
		a	b	c	d
1.	Histidin	-	0,07	-	0,07
2.	Arginin	-	0,24	-	0,07
3.	Metionin	6,26	0,04	5,55	0,04
4.	Valin	-	0,15	-	0,10
5.	Fenilalanin	1,24	0,09	1,88	0,14
6.	Isoleusin	3,80	0,14	2,38	0,09
7.	Leusin	6,23	0,18	2,94	0,08
8.	Lisin	10,46	0,07	10,84	0,07
9.	Threonin	-	-	-	-
10.	Triptofan	-	-	-	-

Keterangan :

- (a) dan (c) : ikan peperek yang dihidrolisis dengan dialisat ekstraselular khamir laut
- (b) dan (d) : ikan peperek yang dihidrolisis dengan ekstraselular khamir laut (Ahmad, 2010)

Tabel 12 memperlihatkan bahwa skor asam amino (banyaknya jumlah asam amino) ikan peperek yang dihidrolisis dengan dialisat ekstraselular khamir laut lebih tinggi bila dibandingkan dengan ikan peperek yang dihidrolisis dengan

ekstraselular khamir laut. Hal ini dimungkinkan karena protease yang terkandung dalam dialisat ekstraselular khamir laut bekerja lebih spesifik dan maksimal dalam menghidrolisis protein ikan peperek. Protease yang terkandung dalam dialisat ekstraselular khamir laut cenderung bekerja seperti protease alkalin. Enzim alkali protease merupakan salahsatu turunan dari enzim serin. Protease alkali ditemukan aktif pada pH antara 8-13 dan banyak yang termasuk ke dalam golongan protease serin subtilisin (Suhartono 2000).

Skor asam amino Ikan peperek yang dihidrolisis dengan dialisat ekstraselular khamir laut lebih tinggi dibandingkan dengan skor asam amino esensial hidrolisat protein ikan herring (*Clupea harengus*) yang dihidrolisis dengan alkalase yang memiliki skor asam amino esensial untuk pangan antara lain histidin 1,6, metionin 1,7, valin 1,3, isoleusin 1,3, leusin 1,9, lisin 1,6, dan treonin 0,9, sedangkan untuk pakan antara lain histidin 0,58, arginin 1,64, metionin 1,59, valin 1,2, fenilalanin 0,52, isoleusin 1,26, leusin 2,6, lisin 1,49, dan treonin 1,2 (Gesualdo dan Chan, 1999). Hal ini menunjukkan bahwa dialisat ekstraselular dapat bekerja lebih efisien dan spesifik dalam menghidrolisis protein ikan peperek.

## 5. PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian ini adalah :

- (a) Dialisat ekstraselular khamir laut dengan berat molekul > 25 kDa yang didialisis pada pH 8 memiliki karakter antara lain konsentrasi protein sebesar 70,5 mg/mL, aktivitas enzim sebesar 67 mU/mL per menit, aktivitas spesifik sebesar 0,950 mU/mg, dan kinetika enzim untuk  $V_{\text{maks}}$  sebesar 8,423 mmol/menit/mg,  $K_M$  sebesar  $2,241 \times 10^3$  mM.
- (b) Dialisat ekstraselular khamir laut memiliki kemampuan menghidrolisis ikan peperek, dengan derajat hidrolisis pada kondisi optimasi pH 12; suhu 50 °C selama 62 menit, berat molekul antara 4-157 kDa. Hasil analisa profil asam amino untuk hidrolisat protein ikan terdeteksi sebanyak 5 asam amino yaitu metionin, fenilalanin, isoleusin, leusin, lisin. Skor asam amino ikan peperek yang dihidrolisis dengan dialisat ekstraselular khamir laut lebih tinggi bila dibandingkan dengan ikan peperek yang dihidrolisis dengan ekstraselular khamir laut.

### 5.2 Saran

Perlu adanya penelitian lebih lanjut mengenai teknik pemurnian protease yang terkandung dalam ekstraselular khamir laut



## DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad, N. R. 2010. *Karakteristik Ekstrak Kasar Khamir Laut dalam Hidrolisis Protein Ikan Peperek (Leiognathus sp.)*. Skripsi. FPIK. UB. Malang.
- Ariyani, F., M. Saleh ., Tazwir., dan N. Hak. 2003. *Optimasi Proses Produksi Hidrolisat Protein Ikan (HPI) dari Mujair (Oreochromis mossambicus)*. Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia.9 :11-18.
- Aulannī`am. 2005. Protein dan Analisisnya. Citra Mentari Group. Malang. Halaman 29-56.
- Aunstrup, K. 1979. *Production, isolation and economic of extracellular enzymes*. Didalam L.B. Wingard, E. Katchalski-katsirdan L. Goldstein (eds.). *Applied Biochem. And Bioengin.* Vol : II. Academic Press, New York.
- Bachrudin Z. 1999. *Laboratory Instructions: isolation, identification and protein staining*. IUC for Biotechnology, Gajah Mada University. Yogyakarta. Indonesia.
- Bamforth CW (2005). *Introduction. Food, Fermentation and Microorganisms*, Blackwell Publishing, UK. Halaman 114-116.
- Barth, G. dan Gardarin, C. 1996. *Yarrowialipolytica*. In: Wolf, K. (Ed.), Non-conventional Yeasts in Biotechnology. Springer-Verlag, Berlin. Halaman 313-388.
- Boyer, H. W., dan Carlton. B. C., (1971), Production of Two Proteolytic Enzymes by A Transformable Strain of *Bacillus subtilis*, Archaebacteria. *Biochemistry*.128 : 442-455.
- Chaplin, M. F. dan C. Bucke. 1990. Enzyme Technology. Great Britain: Cambridge University Press.
- Chi, Z., C. Ma., P. Wang., H. F. Li. 2006. *Optimization of Medium and Cultivation Conditions for Alkaline Protease Production by The Marine Yeast Aureobasidium pullulans*. *Journal of Bioresource Technology*.98 : 534-538.
- Chi, Z., 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. Halaman 343-351.



- Clememte, T. E. 2000. Progeny Analysis of Glyphosate Selected Transgenic Soybeans Derived from *Agrobacterium*-Mediated Transformation. *Crop Science.*40 : 797-803.
- Davidson V. L.dan D. B. Sittman. 1999. *Biochemistry*. LipincottWilliams and Wilkins. Maryland.Halaman 27-34.
- Davis L, et al. 1994. Basic Methods: Molecular Biology. Jilid 2.Norwola:Appletn& Lange.Halaman 68.
- Donaghy, J.A. dan McKay, A.M., 1993.*Production and properties of alkaline protease by Aureobasidium pullulans*.Journal Application Bacterial.74 : 662-666.
- Duetscher, P. M., 1990. *Methods in Enzymology*. Academic Press Inc. New York.Halaman 285-289.
- Faharudin. 2002. Analisa protein Pada Proses Pembuatan Hidrolisat Protein Ikan Peperek (*Leiognathus sp.*) Dengan Starter Marine Yeast. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya. Malang. (tidakditerbitkan)
- FAO/WHO/UNU, 1985.Energy and protein requirements.Report of Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation Technical Report.FAO/WHO and the United Nations University, Geneva.Seri no. 724.
- Fardiaz, S. 1992. MikrobiologiPangan 1. PT. GramediaPustakaUtama. Jakarta.Halaman 57-63.
- Fogarty, W.M. dan C.T. Kelly. 1979. Development, inMikrobialExtracellularEnzyme. Di dalam A. Wiseman (ed.). Topics in Enzyme and Fermentayion Biotechnology Vol : III. John Willey and Son, New York.
- Frazier, W. C. danWesthoff, D.C. 1988. Food. Microbiology. McGraw-Hill Book Company. New York.
- Fujiwara N dan Yamamoto K. 1987.*Production of alkaline protease in low cost medium by alkalophilic Bacillus sp.And properties of the enzyme*.Journal Fermentation Technology.3 : 345-348.
- Gitishree, D. dan M.P. Prasad, 2010.*Isolation, purification and mass production of protease enzyme from bacillus subtilis*.InternationalResearch Journal Microbiology.1 : 026-031.
- Gopakumar, K. 1998. Utilization of Bycath and low-Value Fish in india. Proceeding of the apficsymposium : Fish Utilizatio in asia and The pacific. Oxford and IBH, New Delhi.

- Harris, E.H. (1989) *Chlamydomonas Sourcebook: A Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use*, Academic Press, San Diego
- Hadiwiyoto.1993. *Teknologi Pengolahan Hasil Perikanan*. Jilid 1.Penerbit Liberty. Yogyakarta
- Holme D. J., dan Peck. H. 1993. *Analytical Biochemistry*.Second Edition.John Willey and Sons, Inc. New York.
- Hoyle, N. T., dan J. H. Merrit. 1994. *Quality of Protein Hydrolysates from Herring (Clupeaharengus)*. Journal Food Science.59 : 76-69.
- Ida Bagus. 2004. *Filsafat Penelitian dan Metode Penelitian Sosial*.Pustaka Pelajar.
- Janson, JC., dan L. Ryden., 1998. *Protein Purification Principles, High Resolution Methods and Application 2<sup>nd</sup> Edition*.John Willey and Sons Inc. New York.Halaman 10-31.
- Jay, J. M. 1992. *Modern Food Microbiology*.Fourth Edition.Chapman & Hall. New York.Halaman 7-12.
- Jaziri, A. A. 2010. *Karakteristik Ekstrak Kasar Khamir Laut dalam Hidrolisis Protein Daging Ikan Peperek (Leiognathusspp)*.FPIK.UB. Malang.Halaman 39-48.
- Judoamidjojo, R. M., A. A. Darwis, dan E. G. Sa'id. 1992. *Teknologi Fermentasi*. Rajawali Press. Jakarta.Halaman 10-13.
- Kreger-Van Rij. 1984. *The Yeast a Taxonomic Study. Third Revised dan Enlarged Edition*.ElSavier Science Publisher BV. Amsterdam.Halaman 1082.
- Lehninger, A. L., 1982. *Principles of Biochemistry*. Worth Publishers, New York  
1995. *Dasar-dasar Biokimia*.Jilid 1.Alih Bahasa Thenawidjaja. M,.Penerbit Erlangga. Jakarta.Halaman 67-102.
- Lodish Marque. 2004. *Analytical Chemistry*. Harlow : Prentice Hall.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J, Farr A.L, Randall R.J., 1951. *Protein Measurement With The Folin Phenol Reagent*. *Journal of Biological Chemistry*.Halaman 137-149.
- Ma, C. L., X. M. Ni., Z. M. Chi., L. Y. Ma., dan L. M. Gao. 2007. *Purification and Characterization of an Alkaline Protease from the Marine Yeast Aureobasidium pullulans for Bioactive Peptide Production from Different Sources*.*Journal of Marine Biotechnology*.5 : 343-351.
- McKee, T and R.M. James,. 2003. *Biochemistry : The Molecular Basic of Life*. McGraw Hill. Philadelphia.183 : 47-53.

- Meryandini, A. 2005. Characterization of extracellular Clostridium lituseburens Me1-3 from Meraran Lake in East Nusa Tenggara. *Microbiology*. Indonesia.
- Miller J.N. 2000. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 4<sup>th</sup>ed.
- Moran, N.A., Munson, M.A., Baumann, P., and Ishikawa, H. 1993. *A molecular clock in endosymbiotic bacteria is calibrated using the insect hosts*. Proc R Soc Lond B.253 : 167-171.
- Moreira KA, Calvalcanti MTH, Duarte HS, Tambourgi EB, de Melo EHM, Silva VK, Porto ALF, Filho JLdeL. 2001. Partial characterization of protease from Streptomycesclavuligerus using an inexpensive medium. *Journal Brazilian Microbiology*.32 : 215-220.
- Muchtadi, D., Palupi, S., dan Astawan, M. 1992. *Enzim dalam industri pangan*. PAU PangandanGizi. IPB. Bogor.
- Naiola, B.P.T. Murtiningsih dan Chairil, 1996. Pengaruh stress air terhadap kualitas dan kuantitas komponen aktif pada sambiloto. *Warta Tumbuhan Obat Indonesia*.3 : 15-17.
- Ni.X., yue, L., chi, Z., J. Li., C. Wang, and C. Madzak. 2008. Alkaline protease gene cloning from the marine yeast aurobasidium pululans HN2-3 ad the protease surface display on yarrowia lipolytica for bioactive peptide productions.
- N.R.C., 1993. National Research Council. *Nutrient Requirements of Fish*. Washington.
- Ogrydziak, D.M., 1993. *Yeast extracellular proteases*. Crit. Rev. Biotechnology. No. 13. Halaman 1-55.
- Othmer, K., 1987. *Encyclopedia of Chemical Technology*. John Wiley and Sons Inc. New York. Halaman 180-216.
- Otto HH., Schirmeister T. (1997) Cysteine proteases and their inhibitors. *Chemistry*.
- Owens, R.A., Hammond, R.W., Gardner, R.C., Kiefer, M.C., Thompson, S. M. and Cress, D.E. 1986. *Plant Molecular Biology*.6 : 179-192.
- Pelchar, Ml. dan Chan G.C.S. 1989. *Mikrobiologi*. Mc. Graww Hill Book Company. New York.
- Pigott, G. M. dan B.W. Tucker. 1990. *Seafood :Effect of Technology Hidrolisis*. Marchel Dekker, Inc. New York. Halaman 17-23.



- Ping, W., zheming, C., dan M.A. chunling. 2005. Alkaline Protease Productions by a Strain of Marine Yeast.
- Presscott, S.C. dan Dunn, C.G. 1959. *Industrial microbiology*. Third edition, McGraw-Hill Book Co. New York.
- Prihatmoko.A., 2004.Kajianbioklinisaplikasi starter khamirlautuntukhidrolisat protein ikanpeperek (*leiognathusspp*) padapertumbuhanhewanujimencit.
- Putranto.WS. 2005. Potensi Yeast (Khamir) dalam Produksi Protease Ekstraseluler dan Senyawa AntiMikrobial serta Peluang Aplikasinya pada Industri Pangan. Universitas Padjadjaran. Bandung.
- Quaglia, G.danOrban, E. 1987. Enzymic solubilization of proteins of sardine (Sardinapilchardus) by commercial proteases. *Journal Science Food Agriculture*.38 : 263-269.
- Rahayu, K., 1990. *Isolasi dan Pengujian Aktivitas Enzim.PAU Pangandan Gizi*. Penerbit UGM Press. Yogyakarta. Halaman 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 Molecular Biology Reviews*. Halaman 600-604.
- Reed, G dan T.W. Nagodawithana. 1991. *Yeast Technology. Second edition. Van Nonstrand Reinhold*. New York.
- 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. 70 : 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. Volume 105. Halaman 4524-4529.
- Schomburg D, Salzmann M (1990) Enzyme Handbook, 1. Springer-Verlag, New-York
- Scopes, R. K. 1994. Protein Purification, Principles and Practice. Third edition. Springer-Verlag, New York.
- Sen, H 2005, 'Incubation of European Squid (*Loligo vulgaris* Lamarck, 1798) eggs at different salinities', *Aquaculture Research*.36 : 876-881.



- Shahidi, F., Han, Z.-Q., dan Synowiecki, S.1997. Functional fish protein hydrolysate, in Seafood Safety, Processing and Biotechnology, Shahidi, F., Jones, Y., and Kitts, D. D., Editions, Technomic, Lancaster.
- Sila J, Sauer P., Kolar M. 2009. Comparison of the prevalence of genes coding for enterotoxins, exfoliatins, panton-valentine leukocidin and tsst-1 between methicillin-resistant and methicillin-susceptible isolates of *Staphylococcus aureus* at the university hospital in olomouc. FacUnivPalacky Olomouc Czech Republic.153 : 215-218.
- Sindumarta, M. dan D. Natalia. 1999. Biokimia I: Struktur dan Katalis. Penerbit ITB, Bandung.
- Smith, J.C., 1993. *Prinsip Bioteknologi*. Alih bahasa : A Dharma, PT Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Suhartono MT. 1989. *Enzim dan Bioteknologi*. PAU Bioteknologi. IPB. Bogor.
- \_\_\_\_\_. 1992. Protease. Bogor. IPB Press.
- Suhartono TS. 2000. *Bioteknologi Hasil Laut*. Bogor: Pusat Kajian Sumber Daya Pesisir dan Lautan. Institut Pertanian Bogor.
- Sorensen, H. S., S. Sorensen., C. Bjergegaard., dan S. Michelson. 1999. *Chromatography and Capillary Electrophoresis in Food Analysis*. The Royal of Society of Chemistry. Cambridge. Halaman 25-32.
- Souissi N., A. Bougatef, Y. Triki-Ellouz dan M. Nasri. 2006. *Biochemical and Functional Properties of Sardinella (Sardinella aurita) by -Product Hydrolysates*. Journal Food Technology Biotechnol.45 : 187-194.
- Tobe, S., Takami, T., Ikeda, S., Horikoshi, K., 1976. *Production of some enzymatic properties of alkaline protease of Candida lipolytica*. Agriculture Biology Chemistry.40 : 1087-1092.
- Trenggonodan Sutaji. 2008. *Petunjuk Laboratorium Biokimia Pangan*. PAU Pangandan Gizi UGM, Yogyakarta.
- Volk, W.A. dan Wheeler. 1988. *Mikrobiologi Dasar*. Jilid I Edisi Kelima. Diterjemahkan oleh Markham. Penerbit Erlangga. Jakarta.
- Waluyo.E dan Sukoso. 2004. Analisa Lemak Pada Proses Pembuatan Hidrolisat Protein Ikan Peperek (*Leiognathus, sp*) Dengan Starter Marine Yeast. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya. Malang. (tidak diterbitkan)
- Ward, O.P. 1983. *Proteinase. Microbial and Enzyme Biotechnology*. (W.M. Fogarty eds.) Applied Science Publisher, New York.

- Wilson, K., dan J. Walker, Editor. 2000. Principles and Techniques of Practical Biochemistry. Edisi ke-7. United Kingdom. Cambridge University.
- Winarno, F.G. 1983. *GiziPangan, TeknologidanKonsumsi*. PenerbitGramedia. Jakarta.
- Winarno, F.G., Srikandi F. danDedi F. 1986. PengantarTeknologiPangan. Penerbit PT. Media. Jakarta.
- \_\_\_\_\_. 1986. PengantarTeknologiPangan. PT GramediaPustakaUtama. Jakarta.
- Wiseman, A. 1989. *Handbook of Enzymes Biotechnology. 2nd. Edition*. Ellis Howard, New York.
- WiyantodanSukoso,  
2003.BioprospectingKhamirLautMelaluiPendekatanFisiologisdanIsolasi  
DNA Total.Program PascaSarjana. UniversitasBrawijaya. Malang
- Yatsumi, K. danTakenaka, T., 2000. Characterization Of Brine Proteas As Agents Of Hydrolysis During The Ripening Of Fermented Sardine With Rice-Bran. *Fisheries Science*.



**Lampiran 1. Penghitungan Konsentrasi Protein dari Dialisat ekstrakselular khamir laut Dengan Spektrofotometer**

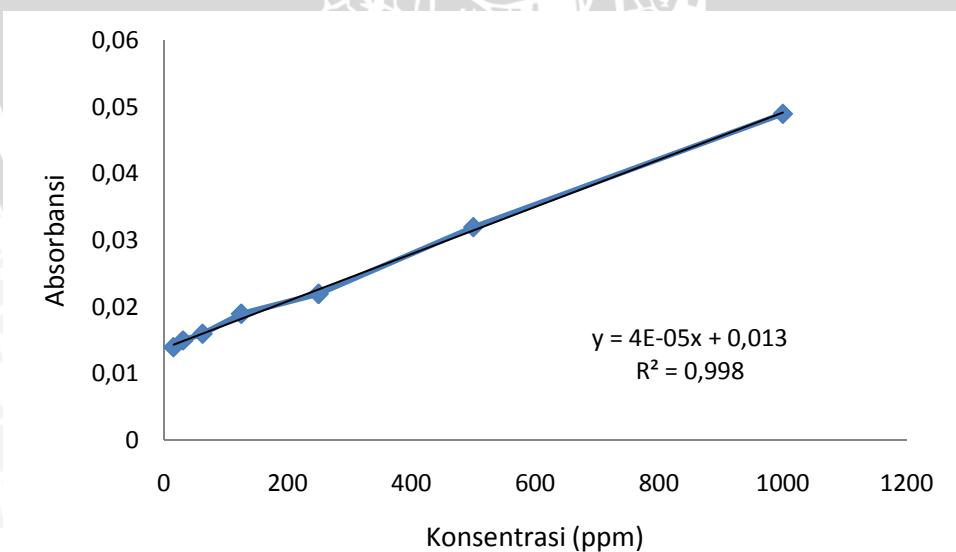
Hasil spektrofotometer pada sampel dialisat ekstrakselular khamir laut

Sampel	Absorbansi
Dialisat ekstraseluler Khamir Laut	0,042

Hasil pembacaan standar protein BSA pada berbagai konsentrasi

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
1000	0,049
500	0,032
250	0,022
125	0,019
62,5	0,016
31,5	0,015
15,625	0,014

Dibuat kurva regresi linear grafik standar BSA yang dibuat dengan Microsoft excel 2007. Grafik standar BSA dapat dilihat pada gambar .



Dari grafik standar tersebut didapatkan persamaan  $y=4E-05x +0.0138$ ,  $R^2=$

0.9985. Sehingga dapat diketahui konsentrasi protein dialisat ekstraselular khamir laut (x) sebesar :

$$y = 4E-05x +0.0138$$

$$0.042 = 0.00004x + 0.0138$$

$$0.042 - 0.0138 = 0.00004x$$

$$0.0282 = 0.00004x$$

$$x = 705 \text{ ppm}$$

Dilakukan pengenceran 100x saat penentuan konsentrasi protein maka :

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi protein} &= 705 \text{ ppm} \times 100 \\ &= 70500 \text{ ppm} \\ &= 70500 \text{ mg/L} \\ &= 70,5 \text{ mg/mL} \end{aligned}$$

Jadi, dalam 1 mL dialisat ekstraselular khamir laut memiliki konsentrasi protein sebesar 70,5 mg protein.



## Lampiran 2. Penghitungan Aktivitas Protease dari Dialisat ekstraselular khamir laut dengan Spektrofotometer

Rumus penghitungan aktivitas dialisat protease ekstraselular khamir laut;

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

Hasil pembacaan spektrofotometer pada masing-masing perlakuan yaitu;

Sampel	Absorbansi
Dialisat ekstraseluler Khamir Laut	0,024
Blanko standar	0,020
	0,023

$$U = \frac{0,024 - 0,020}{0,023 - 0,020} \times 1 \times \frac{1}{20}$$

$$U = 0,067 \text{ U/menit/mL}$$

$$= 67 \text{ mU/menit/mL}$$

Aktivitas spesifik dialisat ekstraseluler khamir laut dapat dihitung;

$$AS = \frac{U}{x} \times \frac{0,067}{70,5}$$

$$= 0,000950 \text{ U/mg}$$

$$= 0,950 \text{ mU/mg}$$

Jadi, dalam 1 mL dialisat ekstraseluler khamir laut memiliki aktivitas protease sebesar 67 mU per menit, dan aktivitas spesifik protease dalam 1 mg sebesar 0,950 mU.



### Lampiran 3. Penghitungan Kecepatan Maksimum ( $V_{maks}$ ) Dan Konstanta Michaelis-Menten ( $K_m$ )

Hasil uji spektrofotometer dari perbandingan enzim : substrat (daging ikan peperek) yaitu:

Konsentrasi (%)	Absorbansi
0,5	1,989
0,25	1,721
0,16	1,406
0,125	1,004
0,1	0,695
0	0

#### Penghitungan Kecepatan Maksimum ( $V_{maks}$ )

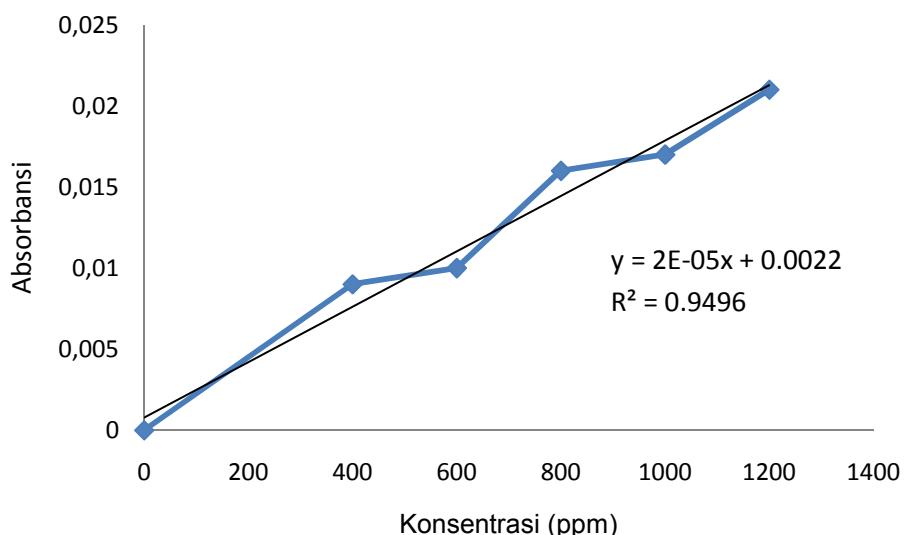
Untuk mendapatkan nilai kecepatan maksimum ( $V_{maks}$ ) dihitung terlebih dulu konsentrasi masing-masing hidrolisat berdasarkan persamaan regresi linear kurva standart tirosin dengan reagen folin-phenol ciocalteau:

Standar tirosin yang digunakan yaitu:

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

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





Dari grafik diatas didapatkan persamaan  $y = 2E-05x + 0.002$  dan  $R^2 = 0.9496$ , sehingga konsentrasi hidrolisat dapat dihitung dengan rumus tersebut untuk mencari konsentrasi (x), hasil absorbansi dimasukkan dalam (y) sebagai berikut:

Konsentrasi (%)	Absorbansi (y)	$X = (y - 0.0022) / 0.00002$	Konsentrasi (ppm)
0,5	1,989	((1,989-0,0022)/0,00002)	99340
0,25	1,721	((1,721-0,0022)/0,00002)	85940
0,16	1,406	((1,406-0,0022)/0,00002)	70190
0,125	1,004	((1,004-0,0022)/0,00002)	50090
0,1	0,695	((0,695-0,0022)/0,00002)	34640

Kecepatan reaksi (v) masing-masing hidrolisis pada berbagai konsentrasi dapat dihitung dengan rumus:

$$V = \text{mol/menit/liter}$$

Konsentrasi Substrat (%)	Konsentrasi Protein (ppm)	mol (gr/mr*)	V (mol/menit**/L)	1/V
0,5	99340	0,548	0,0274	36.49635
0,25	85940	0,474	0,0237	42.19409
0,16	70190	0,387	0,01935	51.67959

0,125	50090	0,276	0.0138	72.46377
0,1	34640	0,191	0.00955	104.71204

\* mr tirosin = 181,19

\*\* waktu saat inkubasi 20 menit

### Penghitungan Konsentrasi Substrat (S)

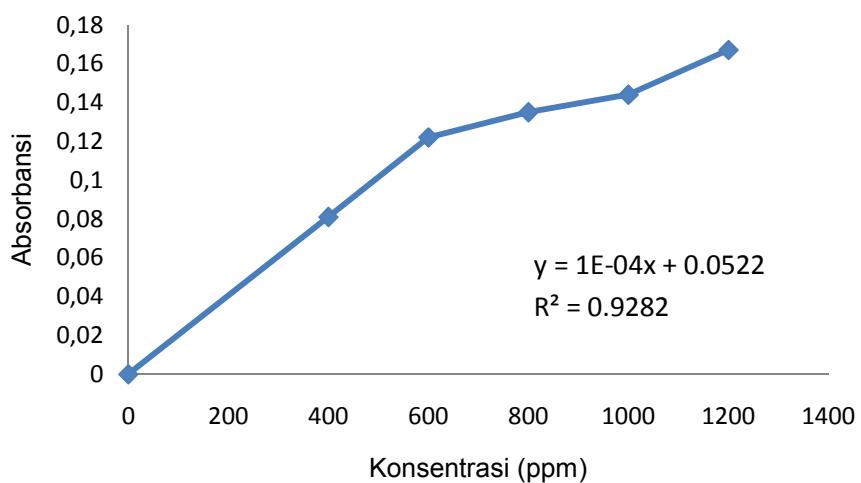
Untuk mendapatkan nilai konsentrasi substrat dihitung terlebih dahulu konsentrasi masing-masing hidrolisat berdasarkan persamaan regresi linear kurva standar BSA dengan reagen biuret yaitu:

Standar BSA yang digunakan yaitu:

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

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





Dari grafik diatas didapatkan persamaan  $y = 1E-04x + 0.0522$  dan  $R^2 = 0.9282$ .

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

Konsentrasi (%)	Absorbansi (y)	$X = (y - 0,0517) / (0,0001x)$	Konsentrasi (ppm)
0,5	1,989	$(1,989 - 0,0517) / (0,0001)$	19373
0,25	1,721	$(1,721 - 0,0517) / (0,0001)$	16688
0,16	1,406	$(1,406 - 0,0517) / (0,0001)$	13538
0,125	1,004	$(1,004 - 0,0517) / (0,0001)$	9518
0,1	0,695	$(0,695 - 0,0517) / (0,0001)$	6428

Konsentrasi substrat (S) hidrolisis konsentrasi substrat dapat dihitung sebagai rumus:

$$S = \text{mol/menit/L}$$

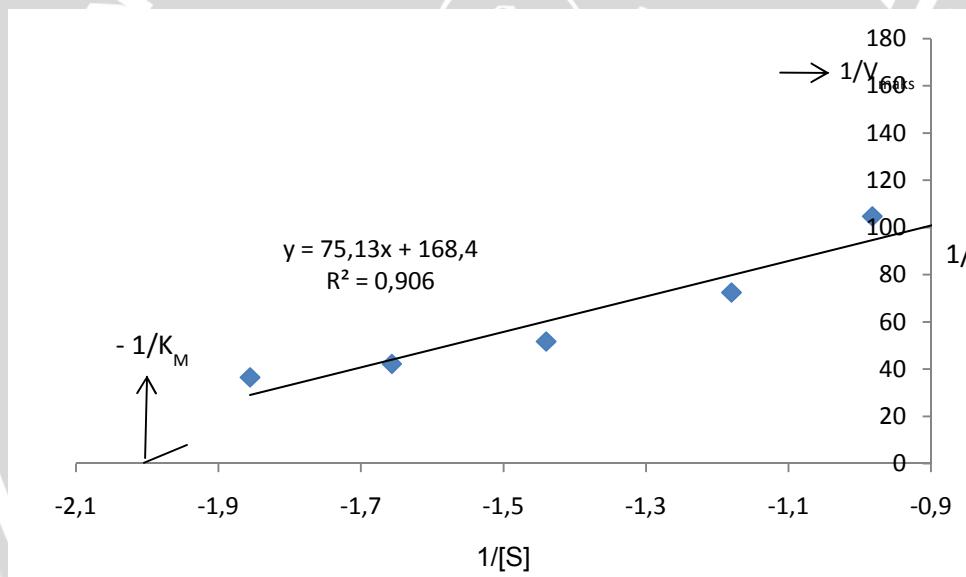
Konsentrasi	Konsentrasi (ppm)	S (mol/menit/L)	Log [S]	1/[S]
0,5	19373	0,289075	-0,5389894	-1,8553240
0,25	16688	0,249075	-0,6036697	-1,6565350
0,16	13538	0,202060	-0,6945196	-1,4398441
0,125	9518	0,142060	-0,8475282	-1,1799017
0,1	6428	0,095940	-1,0180003	-0,9823180

\* mr BSA = 67000

\*\* waktu saat inkubasi 20 menit

### Penghitungan 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 menggunakan Microsoft Excel 2007.



### Perhitungan $V_{maks}$ (mol x liter<sup>-1</sup> x min<sup>-1</sup>)

Untuk mengetahui kecepatan reaksi maksimum ekstrak protease kasar khamir laut dalam menghidrolisis protein ikan peperek dapat diketahui dari persamaan kurva linear diatas  $y = 75,13x + 168,4$ . Untuk mendapatkan kecepatan reaksi maksimum (y), x harus dijadikan nol. Perhitungannya sebagai berikut:

$$Y = 75,13x + 168,4$$

$$1/V_{\text{maks}} = 75.131x + 168.4$$

$$1/V_{\text{maks}} = 75.131 \times 0 + 168.4$$

$$1/V_{\text{maks}} = 168.4$$

$$V_{\text{maks}} = 1/168.4$$

$$V_{\text{maks}} = 0.00593824 \text{ min}^{-1}$$

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

$$V_{\text{maks}} = 0.00593824 \text{ mol x liter}^{-1} \times \text{min}^{-1} / 70.5 \text{ mg/L} \text{ (konsentrasi protein ekstrak khamir laut)}$$

$$V_{\text{maks}} = 8.4230 \text{ mmol x liter}^{-1} \times \text{g}^{-1}$$

### Perhitungan $K_M$ (M)

Untuk mengetahui afinitas enzim substrat (ES) dapat diketahui dari persamaan kurva linear Lineweaver-Burk yaitu  $y = 75.131x + 168.4$  dimana untuk mendapatkan nilai  $K_M$  ( $x$ ),  $y$  harus dijadikan nol. Perhitungannya sebagai berikut:

$$y = 75.131x + 168.4$$

$$y = 75.131 \times (-1/K_M) + 168.4$$

$$0 = 75.131 \times (-1/K_M) + 168.4$$

$$(-1/K_M) = -168.4/75.131$$

$$1/K_M = 2.241418 \text{ M}$$



#### Lampiran 4. Penghitungan Derajat Hidrolisis (DH)

**Derajat hidrolisis waktu dihitung dengan rumus:**

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

Uji nitrogen dilakukan dengan metode Kjeldahl dan absorbansinya dibaca dengan spektrofotometer. Hasil uji nitrogen total dan nitrogen terlarut terhadap sampel hidrolisat protein ikan peperek dengan spektrofotometer yaitu:

##### N Total

Waktu (menit)	Absorbansi
0	0,340
25	0,365
50	0,380
75	0,385
100	0,385

##### 10% - Nitrogen terlarut dalam sampel

Waktu (menit)	Absorbansi
0	0,150
25	0,165
50	0,150
75	0,180
100	0,175



Standarnitrogen yang digunakan adalah larutan Nestler. Hasil spektrofotometri pada standar larutan Nestler pada masing-masing konsentrasi yaitu:

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
0,2	0,02
0,6	0,035
1,0	0,06
1,4	0,08

Dari hasil tersebut didapatkan persamaan :

$$\text{Slop (A)} = \frac{\sum xy}{\sum x^2} = 0,0586$$

Pengenceran yang dilakukan terhadap sampel hidrolisat protein ikan peperek saat uji kjeldahl yaitu sebanyak 2500 kali, sehingga dapat dihitung konsentrasi N total dan N terlarut berdasarkan persamaan dan pengenceran yang dilakukan yaitu:

Perhitungan N Total

HPI	Waktu (menit)	Absorbansi	$\left[ \frac{\text{Abs}}{0,0586} \times 2500 \right] / 10.000$
1	0	0,340	1,451
2	25	0,365	1,557
3	50	0,380	1,621
4	75	0,385	1,642
5	100	0,385	1,642

Perhitungan Nitrogen terlarut dalam sampel

HPI	Waktu (menit)	Absorbansi	$\left[ \frac{\text{Abs}}{0,0586} \times 2500 \right] / 10.000$
1	0	0,150	0,640
2	25	0,165	0,704
3	50	0,150	0,640
4	75	0,180	0,768



5	100	0,175	0,747
---	-----	-------	-------

Dari nilai perhitungan N total dan N terlarut tersebut kemudian dimasukkan dalam rumus derajat hidrolisis yaitu:

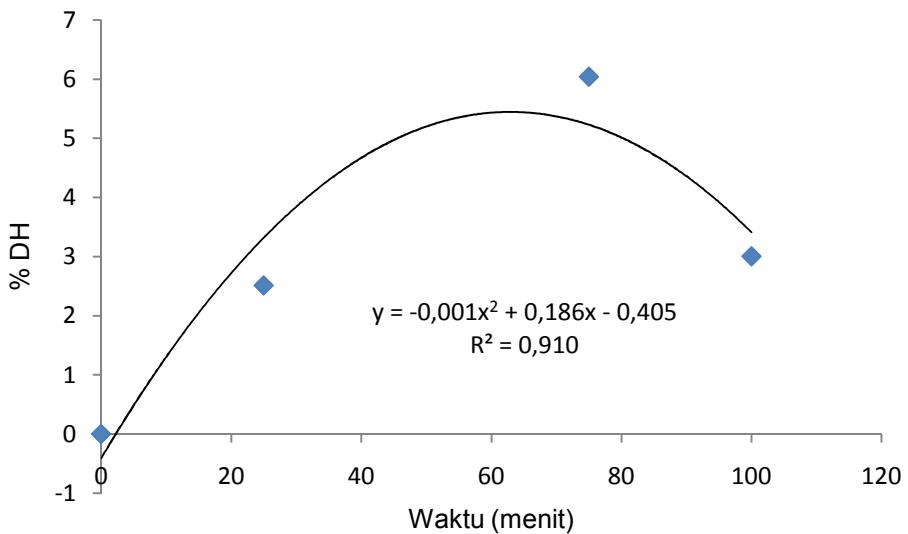
HPI	N Total	N terlarut	$\frac{10\% \text{ ICA} - \text{N terlarut}}{\text{DH}\%} \times 100\%$	DH (%)
1	1,451	0,640	(0,640/ 1,451) x 100	44.10751
2	1,557	0,704	(0,704/ 1,557) x 100	45.21516
3	1,621	0,640	(0,640/ 1,621) x 100	39.48180
4	1,642	0,768	(0,768/ 1,642) x 100	46.77223
5	1,642	0,747	(0,746/ 1,642) x 100	45.43240

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

HPI	Waktu	DH	(nilai DH pada perlakuan waktu-nilai DH saat nol menit)/ nilai DH saat nol menit x 100	DH (%)
1	0	44.10751	(44.10751 - 44.10751)/ 44.10751 x 100	0
2	25	45.21516	(45.21516 - 44.10751)/ 44.10751 x 100	2.5112504
3	50	39.48180	(39.48180- 44.10751)/ 44.10751 x 100	-10.4873524
4	75	46.77223	(46.77223- 44.10751)/ 44.10751 x 100	6.0414202
5	100	45.43240	(45.43240 - 44.10751)/ 44.10751 x 100	3.0037742

Dari hasil diatas kemudian dibuat kurva hubungan antara waktu hidrolisis dan nilai DH masing-masing hidrolisat. Waktu sebagai sumbu x dan DH sebagai sumbu y:





Dari kurva tersebut didapatkan persamaan:

$$y = -0.0015x^2 + 0.1861x - 0.4057$$

Kemudian diturunkan menjadi

$$y = -0.003x + 0.1861$$

untuk mendapatkan waktu optimum proses hidrolisis, sumbu y dari persamaan tersebut dibuat menjadi nol, sehingga dapat dihitung:

$$y = -0.003x + 0.1861$$

$$0 = -0.003x + 0.1861$$

$$x = 62$$

Sehingga didapatkan nilai % DH :

$$y = -0.0015(62)^2 + 0.1861(62) - 0.4057$$

$$y = -0.004 (3.844)^2 + 11.5382 + 0.806$$

$$y = -5.766 + 11.5382 + 0.806$$

$$y = 6.5782$$



Jadi, waktu optimasi dialisat ekstraselular khamir laut untuk menghidrolisis dalam pembuatan hidrolisis protein ikan peperek selama 62 menit dengan % DH sebesar 6,5782% (6,6%).

**Derajat hidrolisis suhu dihitung dengan rumus:**

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

Uji nitrogen dilakukan dengan metode kjehdahl dan absorbansinya dibaca dengan spektrofotometer. Hasil uji nitrogen total dan nitrogen terlarut terhadap sampel hidrolisat protein ikan peperek dengan spektrofotometer yaitu:

N Total

Suhu (°C)	Absorbansi
35	0.365
40	0.380
45	0.395
50	0.405
55	0.380

10% - Nitrogen terlarut dalam sampel

Suhu (°C)	Absorbansi
35	0.150
40	0.175
45	0.200
50	0.205
55	0.190



Standarnitrogen yang digunakan adalah larutan nestler. Hasil spektrofotometri pada standar larutan nestler pada masing-masing konsentrasi yaitu:

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
0,2	0,02
0,6	0,035
1,0	0,06
1,4	0,08

Dari hasil tersebut didapatkan persamaan :

$$\text{Slop (A)} = \frac{\sum xy}{\sum x^2} = 0,0586$$

Pengenceran dilakukan terhadap sampel hidrolisat protein ikan peperek saat uji kjehdahl yaitu sebanyak 2500 kali, sehingga dapat dihitung konsentrasi N total dan N terlarut berdasarkan persamaan dan pengenceran yang dilakukan yaitu:

#### Perhitungan N Total

Suhu (°C)	Absorbansi	$\left[ \frac{\text{Abs}}{0,0586} \times 2500 \right] / 10.000$
35	0,365	1,557
40	0,380	1,621
45	0,395	1,685
50	0,405	1,728
55	0,380	1,621

#### Perhitungan Nitrogen terlarut dalam sampel

Suhu (°C)	Absorbansi	$\left[ \frac{\text{Abs}}{0,0586} \times 2500 \right] / 10.000$

35	0.150	0.640
40	0.175	0.747
45	0.200	0.853
50	0.205	0.875
55	0.190	0.811

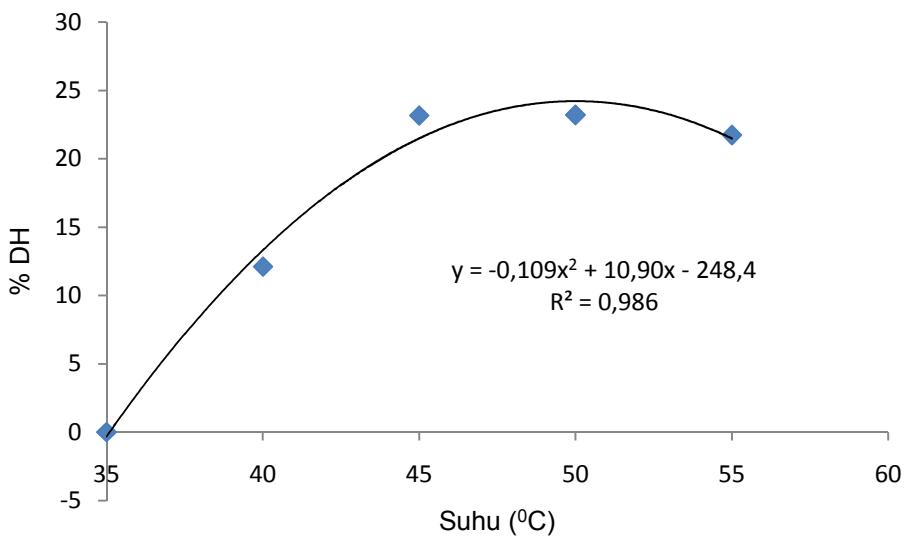
Dari nilai perhitungan N total dan N terlarut tersebut kemudian dimasukkan dalam rumus derajat hidrolisis yaitu:

HPI	N Total	N terlarut	DH% = $\frac{10\% \text{TCA} - \text{N terlarut}}{\text{N total}} \times 100\%$	DH (%)
1	1,557	0.640	$(0.640/1,557) \times 100$	41.10468
2	1,621	0.747	$(0.747/1,621) \times 100$	46.08266
3	1,685	0.853	$(0.853/1,685) \times 100$	50.62314
4	1,728	0.875	$(0.875/1,728) \times 100$	50.63657
5	1,621	0.811	$(0.811/1,621) \times 100$	50.03084

Diasumsikan bahwa saat perlakuan suhu selama nol menit belum ada Nitrogen yang dibebaskan, sehingga nilai DH diatas dapat dikonversikan menjadi:

HPI	Suhu	DH	(nilai DH pada perlakuan waktu-nilai DH saat nol menit)/ nilai DH saat nol menit x 100	DH (%)
1	35	41.10468	$(41.10468 - 41.10468)/41.10468 \times 100$	0
2	40	46.08266	$(46.08266 - 41.10468)/41.10468 \times 100$	12.1104945
3	45	50.62314	$(50.62314 - 41.10468)/41.10468 \times 100$	23.1566333
4	50	50.63657	$(50.63657 - 41.10468)/41.10468 \times 100$	23.1893059
5	55	50.03084	$(50.03084 - 41.10468)/41.10468 \times 100$	21.7156781

Dari hasil diatas kemudian dibuat kurva hubungan antara suhu hidrolisis dan nilai DH masing-masing hidrolisat. Suhu sebagai sumbu x dan DH sebagai sumbu y:



Dari kurva tersebut didapatkan persamaan:

$$y = -0,1091x^2 + 10,908x - 248,48$$

Kemudian diturunkan menjadi

$$y = -0,2182x + 10,908$$

untuk mendapatkan suhu optimum proses hidrolisis, sumbu y dari persamaan tersebut dibuat menjadi nol, sehingga dapat dihitung:

$$y = -0,2182x + 10,908$$

$$0 = -0,2182x + 10,908$$

$$x = 49,99 \text{ atau } 50$$

Sehingga didapatkan nilai % DH :

$$y = -0,1091x^2 + 10,908x - 248,48$$

$$y = -0,1091 (2.500) + 10,908 (50) - 248,48$$

$$y = -272,75 + 545,4 - 248,48$$

$$y = 24,17$$

Jadi, suhu optimasi dialisat ekstraselular khamir laut untuk menghidrolisis dalam pembuatan hidrolisis protein ikan peperek pada suhu 50°C dengan % DH sebesar 24,17 (24).

#### **Derajat hidrolisis pH dihitung dengan rumus:**

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

Uji nitrogen dilakukan dengan metode Kjeldahl dan absorbansinya dibaca dengan spektrofotometer. Hasil uji nitrogen total dan nitrogen terlarut terhadap sampel hidrolisat protein ikan peperek dengan spektrofotometer yaitu:

**N Total**

pH	Absorbansi
8	0.400
9	0.365
10	0.350
11	0.328
12	0.320

**10% - Nitrogen terlarut dalam sampel**

pH	Absorbansi
8	0.120
9	0.128
10	0.130
11	0.129
12	0.128

Standarnitrogen yang digunakan adalah larutan Nestler. Hasil spektrofotometri pada standart larutan Nestler pada masing-masing konsentrasi yaitu:



Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
0,2	0,02
0,6	0,035
1,0	0,06
1,4	0,08

Dari hasil tersebut didapatkan persamaan :

$$\text{Slop (A)} = \Sigma xy / \Sigma x^2 = 0,0586$$

Pengenceran yang dilakukan terhadap sampel hidrolisat protein ikan peperek saat uji Kjeldahl yaitu sebanyak 2500 kali, sehingga dapat dihitung konsentrasi N total dan N terlarut berdasarkan persamaan dan pengenceran yang dilakukan yaitu:

#### Perhitungan N Total

pH	Absorbansi	$\left[ \frac{\text{Abs}}{0,0586} \times 2500 \right] / 10.000$
8	0.400	1,706
9	0.365	1,557
10	0.350	1,493
11	0.328	1,400
12	0.320	1,365

#### Perhitungan Nitrogen terlarut dalam sampel

pH	Absorbansi	$\left[ \frac{\text{Abs}}{0,0586} \times 2500 \right] / 10.000$
8	0.120	0.512
9	0.128	0.546
10	0.130	0.555
11	0.129	0.550
12	0.128	0.546



Dari nilai perhitungan N total dan N terlarut tersebut kemudian dimasukkan dalam rumus derajat hidrolisis yaitu:

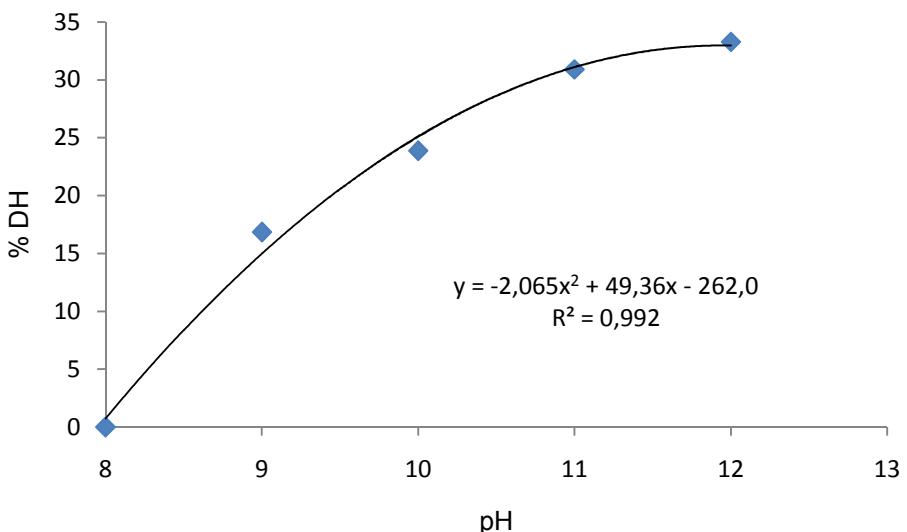
N Total	N terlarut	$DH\% = \frac{10\%TCA - N \text{ terlarut}}{N \text{ total}} \times 100\%$	DH (%)
1,706	0.512	(0.512/ 1,706) x 100	30.01172
1,557	0.546	(0.546/ 1,557) x 100	35.06744
1,493	0.555	(0.555/ 1,493) x 100	37.17348
1,400	0.550	(0.550/ 1,400) x 100	39.28571
1,365	0.546	(0.546/ 1,365) x 100	40

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

HPI	pH	DH	(nilai DH pada perlakuan waktu-nilai DH saat nol menit)/ nilai DH saat nol menit x 100	DH (%)
1	8	30.01172	(30.01172 - 30.01172)/ 30.01172 x 100	0
2	9	35.06744	(35.06744 - 30.01172)/ 30.01172 x 100	16.8458189
3	10	37.17348	(37.17348 - 30.01172)/ 30.01172 x 100	23.8632108
4	11	39.28571	(39.28571 - 30.01172)/ 30.01172 x 100	30.9012279
5	12	40	(40 - 30.01172)/ 30.01172 x 100	33.2812648

Dari hasil diatas kemudian dibuat kurva hubungan antara pH hidrolisis dan nilai DH masing-masing hidrolisat.pH sebagai sumbu x dan DH sebagai sumbu y:





Dari kurva tersebut didapatkan persamaan:

$$y = -2.0651x^2 + 49.363x - 262.02$$

Kemudian diturunkan menjadi

$$Y = -4.1302x + 49.363$$

untuk mendapatkan pH optimum proses hidrolisis, sumbu y dari persamaan tersebut dibuat menjadi nol, sehingga dapat dihitung:

$$y = -4.1302x + 49.363$$

$$0 = -4.1302x + 49.363$$

$$x = 11.95 = 12$$

Jadi derajat hidrolisis maksimum dicapai pada pH 12.

$$y = -2.0651x^2 + 49.363x - 262.02$$

$$y = -2.0651 (144) + 49,363 (12) - 262,02$$

$$y = -297,374 + 592,356 - 262,02$$

$$y = 32.962$$

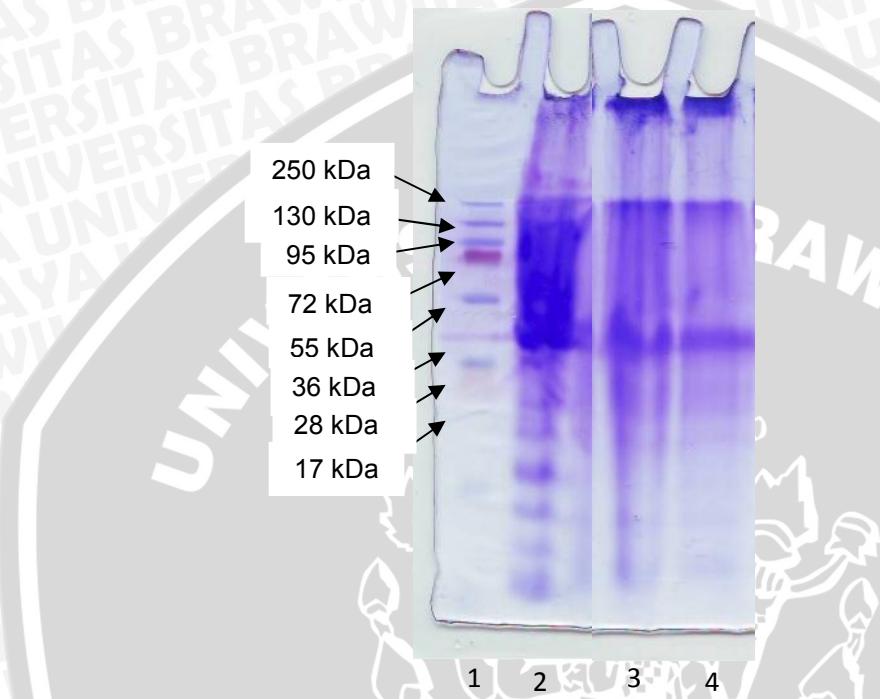


Jadi, pH optimasi dialisat ekstraselular khamir laut untuk menghidrolisis dalam pembuatan hidrolisis protein ikan peperek pada pH 12 dengan % DH sebesar 32.962% (33%).



### Lampiran 5. Penghitungan Berat Molekul (SDS PAGE)

Hasil SDS-PAGE hidrolisat protein ikan peperek



Gambar 6. Profil Pita Peptida

- Keterangan:
1. *Marker prestained protein ladder*
  2. Ikan peperek
  3. HPI peperek hasil hidrolisis dialisat tanpa pengenceran
  4. HPI peperek hasil hidrolisis dialisat dengan pengenceran

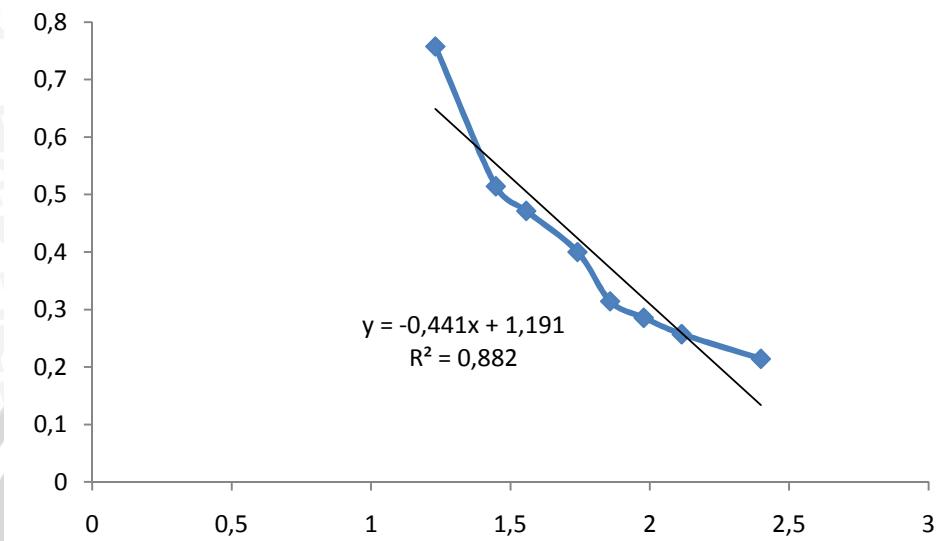
Diukur jarak tracking masing-masing pita protein hasil gel elektroforesis

Jarak penuh tracking yaitu = 70 mm

Marker asam amino (17-250 kDa):

BM(kDa)	Log BM	Jarak Tracking	R <sub>f</sub>
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:



Persamaan  $y = -0,4412x + 1,1917$  digunakan untuk mendapatkan nilai BM dari sampel hidrolisat protein ikan peperek dan sampel protein ikan peperek tanpa hidrolisis. Dengan cara menghitung terlebih dahulu menghitung:

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

$$\text{Log BM} (x) = y - 1,1917 / -0,4412$$

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

Sehingga didapatkan untuk berat molekul substrat ikan peperek dan hidrolisat ikan peperek yaitu:

- Berat Molekul (kDa) Peptida Protein Ikan Peperek :

BM(kDa)	Jarak Tracking	Log BM	Rf
157,10	15	2,19618617	0,214285714
125,67	18	2,09922431	0,257142857
74,64	25	1,87297996	0,357142857
59,71	28	1,7760181	0,4
51,45	30	1,71137686	0,428571429
41,15	33	1,614415	0,471428571
32,92	36	1,51745314	0,514285714
22,69	41	1,35585003	0,585714286
15,64	46	1,19424693	0,657142857
10,78	51	1,03264383	0,728571429
7,43	56	0,87104072	0,8
5,12	61	0,70943762	0,871428571
3,53	66	0,54783452	0,942857143

- Berat Molekul (kDa) Peptida Hidrolisat Protein ikan Peperek yang dihidrolisis dengan Dialisat Ekstraselular Khamir Laut tanpa pengenceran :

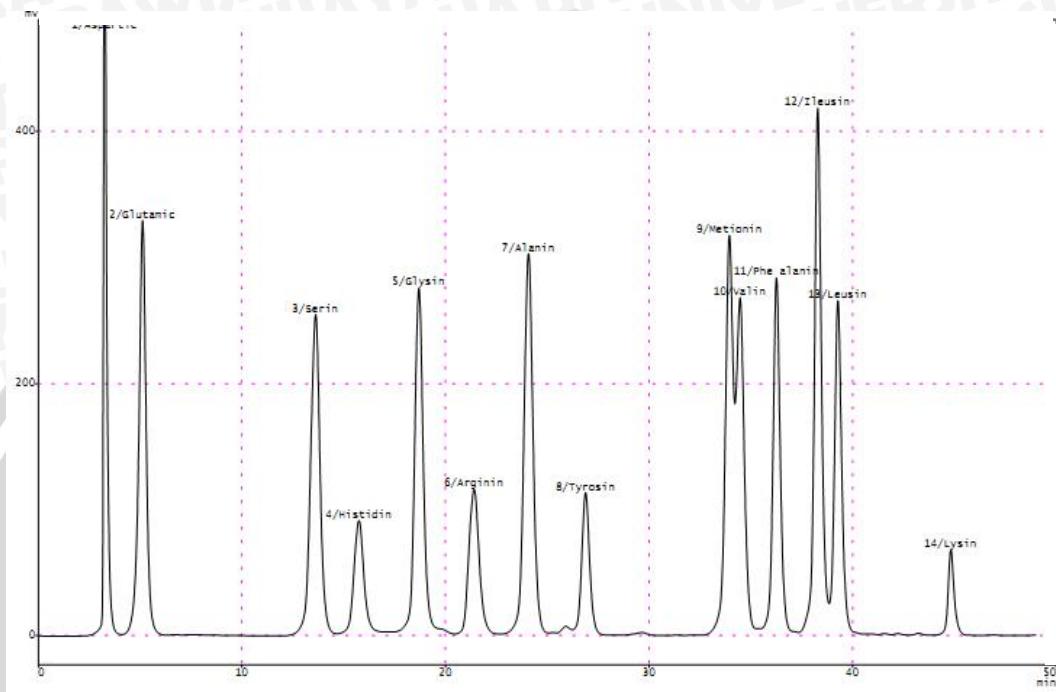
BM(kDa)	Jarak Tracking	Log BM	Rf
157.1036108	15	2.196186167	0.214286
41.15427893	33	1.614414997	0.471429
22.69081173	41	1.355850032	0.585714
15.64036664	46	1.19424693	0.657143
7.430888144	56	0.871040724	0.8
4.09709241	64	0.61247576	0.914286

- Berat Molekul (kDa) Peptida Hidrolisat Protein ikan Peperek yang dihidrolisis dengan Dialisat Ekstraselular Khamir Laut dengan pengenceran PBS 1:1 :

BM(kDa)	Jarak Tracking	Log BM	Rf
157.1036	15	2.196186	0.214286
41.15428	33	1.614415	0.471429
22.69081	41	1.35585	0.585714
15.64037	46	1.194247	0.657143
9.289719	53	0.968003	0.757143
7.430888	56	0.871041	0.8
4.097092	64	0.612476	0.914286

### Lampiran 6. Penghitungan Skor Asam Amino

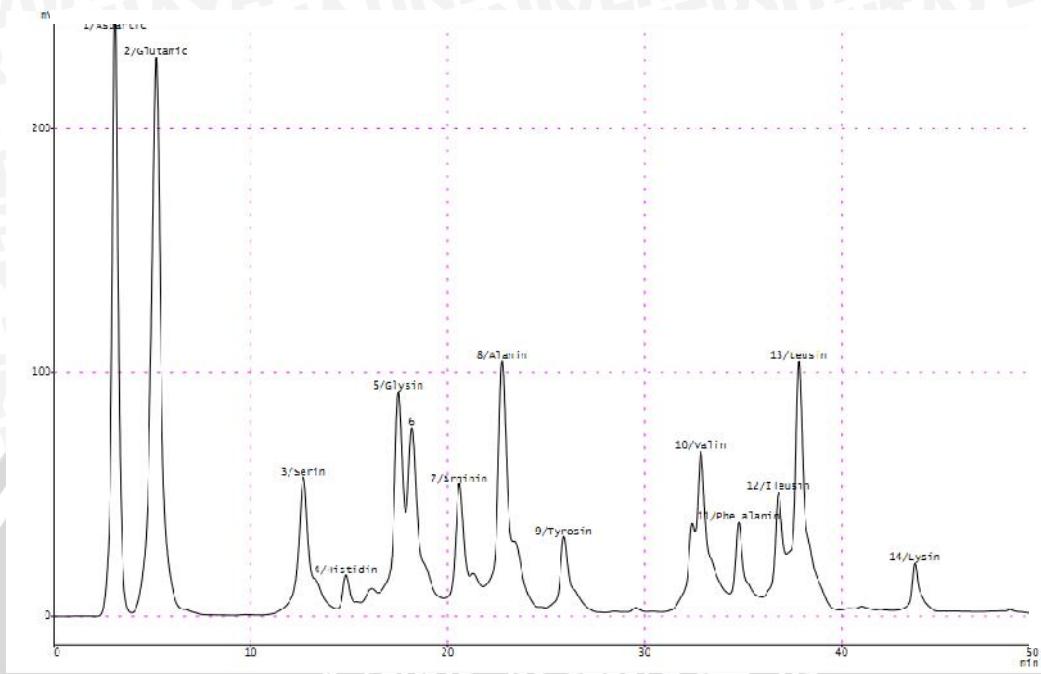
Kromatogram standar yaitu:



PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	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

Kromatogram ikan peperek yaitu:

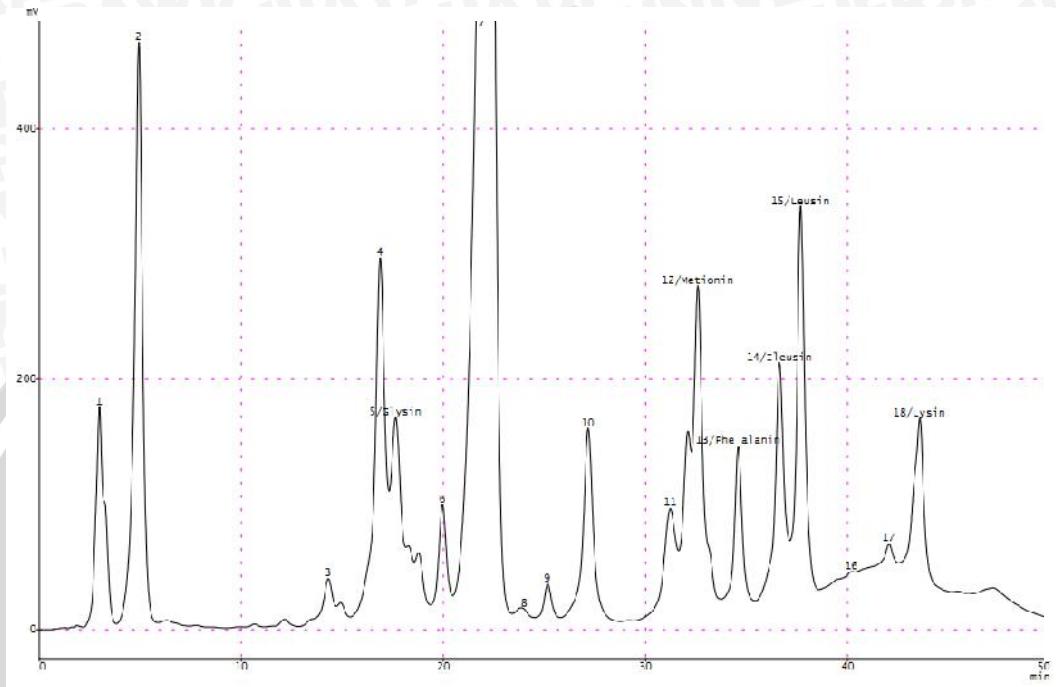


PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	NAME
1	3.104	5701431	253505	Aspartic
2	5.189	8408353	228177	Glutamic
3	12.663	2368930	54757	Serin
4	14.830	288854	12548	Histidin
5	17.485	2517706	81434	Glysin
7	20.582	1813099	47194	Arginin
8	22.750	4271873	97673	Alanin
9	25.891	1110003	29163	Tyrosin
10	32.845	3712979	65357	Valin
11	34.759	1374373	35566	Phe alanin
12	36.783	1659051	48235	Ileusin
13	37.817	4135897	99414	Leusin
14	43.711	565861	19180	Lysin

37928409      1072202



Kromatogram hidrolisat ikan peperek yang dihidrolisis dengan dialisat khamir laut yaitu:



PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	NAME
5	17.621	8883469	164733	Glysin
12	32.568	12820957	257810	Metionin
13	34.567	4088799	128597	Phe alanin
14	36.611	6971436	192707	Ileusin
15	37.654	9587799	310296	Leusin
18	43.540	6112879	139683	Lysin

48465338      1193826

### Kadar Asam Amino Ikan Peperek

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

Profil Asam Amino	Luas area sampel	Luas area standar	luas area sampel/ luas area standar	Hasil
Aspartic	5701431	6726310	0.847631316	1483.354804
Glutamic	8408353	8220281	1.022879023	1790.038291
Serin	2368930	8317215	0.284822504	498.4393815
Histidin	288854	3283669	0.087966844	153.9419777
Glysin	2517706	8473217	0.297136967	519.9896922
Arginin	1813099	4109914	0.44115254	772.0169449
Alanin	4271873	9401683	0.454373222	795.1531391
Tyrosin	1110003	2897836	0.383045486	670.3296011
Valin	3712979	6708633	0.553462829	968.559951
Phe alanin	1374373	7112369	0.193237021	338.1647873
Ileusin	1659051	10277625	0.161423578	282.4912614
Leusin	4135897	6532151	0.633160042	1108.030073
Lisin	565861	1435243	0.39426146	689.9575542

Asam amino ikan peperek dalam gram asam amino/ 100 gram mengandung:

Profil Asam Amino	ppm	µg/ mL	gr/ mL	gr/ gr	gr/ 100 gr
Aspartic	1483.354804	74167.74019	0.07	1.24	123.61
Glutamic	1790.038291	89501.91453	0.09	1.49	149.17
Serin	498.4393815	24921.96907	0.02	0.42	41.54
Histidin	153.9419777	7697.098885	0.01	0.13	12.83
Glysin	519.9896922	25999.48461	0.03	0.43	43.33
Arginin	772.0169449	38600.84724	0.04	0.64	64.33
Alanin	795.1531391	39757.65695	0.04	0.66	66.26
Tyrosin	670.3296011	33516.48006	0.03	0.56	55.86
Valin	968.559951	48427.99755	0.05	0.81	80.71
Phe alanin	338.1647873	16908.23936	0.02	0.28	28.18
Ileusin	282.4912614	14124.56307	0.01	0.24	23.54
Leusin	1108.030073	55401.50365	0.06	0.92	92.34
Lisin	689.9575542	34497.87771	0.03	0.57	57.50

### Kadar Asam Amino HPI Ikan Peperek

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



Profil Asam Amino	Luas area sampel	Luas area standar	luas area sampel/ luas area standar	Hasil
Glysin	8.883.469	8.473.217	1,05	1834,73
Metionin	12.820.957	9.241.849	1,39	2427,73
Phe alanin	4.088.799	7.112.369	0,57	1006,05
Ileusin	6.971.436	10.277.625	0,68	1187,05
Leusin	9.587.799	6.532.151	1,47	2568,63
Lysin	6.112.879	1.435.243	4,26	7453,47

- Total berat sampel uji yaitu= 400 gram ikan peperek dilarutkan dalam 400mL air menghasilkan 700 mL supernatan
- Volume injeksi dalam kolom HPLC yaitu sebanyak 20  $\mu\text{L}$
- Sehingga dapat dihitung skor asam amino essensial semisal untuk asam amino glisin yaitu:
  1. Dalam volume 20 L mengandung 1.834,731  $\mu\text{g}$
  2. Dalam 1 mL mengandung 91.736,53  $\mu\text{g}$
  3. Dalam 80 mL mengandung 7.338.922,51  $\mu\text{g}$
  4. Dalam 80 mL atau dari 50 gram bahan mengandung 7,34 gram
  5. Dalam 100 gram bahan mengandung 14,68 gram glisin

Profil Asam Amino	Kandungan asam amino HPI ikan peperek (gr/100gr)
Glysin	14.68
Metionin	19.42
Phe alanin	8.05
Ileusin	9.50
Leusin	20.55
Lysin	59.63

Skor masing-masing asam amino essensial ikan peperek berdasarkan NRC dan FAO/WHO dapat dihitung dengan rumus:

Skor asam amino essensial HPI peperek berdasarkan NRC =

$$\frac{\text{Skor asam amino HPI peperek (gr/100 gr)}}{\text{NRC}}$$

Skor asam amino essensial HPI peperek berdasarkan FAO/ WHO =

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

Sehingga untuk masing-masing asam amino essensial didapatkan hasil seperti dalam tabel:

No.	Profil Asam Amino	Skor Asam Amino Esensial			
		NRC		FAO	
		a	b	d	e
1.	Histidin	-	0,07	-	0,07
2.	Arginin	-	0,24	-	0,07
3.	Metionin	6,26	0,04	5,55	0,04
4.	Valin	-	0,15	-	0,10
5.	Fenilalanin	1,24	0,09	1,88	0,14
6.	Isoleusin	3,80	0,14	2,38	0,09
7.	Leusin	6,23	0,18	2,94	0,08
8.	Lisin	10,46	0,07	10,84	0,07
9.	Threonin	-	-	-	-
10.	Triptofan	-	-	-	-

\* NRC merupakan standar protein asam amino esensial untuk pakan

\* FAO/WHO merupakan referensi kebutuhan asam amino esensial bagi manusia

Keterangan :

- (a) dan (d) : ikan peperek yang dihidrolisis dengan dialisat ekstraselular khamir laut
- (b) dan (e) : ikan peperek yang dihidrolisis dengan ekstraselular khamir laut (Ahmad, 2010)

