

**PENGARUH KHAMIR LAUT JENIS CAMPURAN YANG DIPANEN PADA FASE
LOG DALAM MENGHIDROLISIS PROTEIN KERANG DARAH (*Anadara granosa*)**

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

Oleh :
ALIF KHOLIFATUL JANNAH
NIM. 0810830041



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

MALANG

2012

**PENGARUH KHAMIR LAUT JENIS CAMPURAN YANG DIPANEN PADA FASE
LOG DALAM MENGHIDROLISIS PROTEIN KERANG DARAH (*Anadara granosa*)**

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

Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Meraih Gelar Sarjana Perikanan di
Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan
Universitas Brawijaya

Oleh :
ALIF KHOLIFATUL JANNAH
NIM. 0810830041



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



2012

LAPORAN SKRIPSI

PENGARUH KHAMIR LAUT JENIS CAMPURAN YANG DIPANEN PADA FASE
LOG DALAM MENGHIDROLISIS PROTEIN KERANG DARAH (*Anadara granosa*)

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Oleh:

ALIF KHOLIFATUL JANNAH

NIM.0810830041

Mengetahui,
Ketua Jurusan

(Dr. Ir. Happy Nursyam, MS)

NIP. 19600322 198601 1 001

Tanggal :

Menyetujui,
Dosen Pembimbing I

(Prof. Ir. Sukoso, MSc. Ph.D.)

NIP: 196409 19198903 1 002

Tanggal :

Dosen Pembimbing II

(Dr. Ir. Muhamad Firdaus, MP.)

NIP : 196809 19200501 1 001

Tanggal :

RINGKASAN

ALIF KHOLIFATUL J (0810830041). Pengaruh Khamir Laut Jenis Campuran yang Dipanen pada Fase Log dalam Menghidrolisis Protein Kerang Darah (*Anadara granosa*) (Prof. Ir. SUKOSO, M.Sc. Ph.D dan Dr. Ir. MUHAMAD FIRDAUS, MP)

Pemanfaatan khamir laut sebagai sumber protease pada penelitian terdahulu telah dilakukan dengan mengkultur khamir laut selama 10 hari dan dari hasil penelitiannya menunjukkan bahwa sel khamir laut yang diperoleh tidak banyak. Hasil tersebut menunjukkan bahwa perlu adanya penelitian lebih lanjut untuk menentukan waktu panen yang tepat yaitu pada fase log khamir laut. Pemanfaatan khamir laut pada penelitian terdahulu telah diaplikasikan pada pembuatan hidrolisat protein ikan (HPI) dengan substrat dari ikan peperek. Substrat dari hasil perikanan dipilih sebagai hidrolisat protein karena memiliki tingkat kelarutan dan pencernaan yang cukup tinggi. Hasil perikanan lainnya yang kurang ekonomis seperti kerang-kerangan belum banyak dimanfaatkan khususnya kerang darah. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan fase log khamir laut dan pengaruh khamir laut yang dipanen pada fase log dalam menghidrolisis protein kerang darah (*Anadara granosa*).

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksploratif. Penelitian ini dilakukan dalam dua tahap yaitu penelitian pendahuluan dan penelitian utama. Penelitian pendahuluan dilakukan untuk mengetahui fase log khamir laut dan untuk mengetahui substrat yang cocok untuk dihidrolisis dengan volume khamir laut yang optimal dalam menghidrolisis protein kerang darah berdasarkan Derajat Hidrolisis (DH) yang dihasilkan. Volume khamir laut yang terbaik digunakan untuk acuan pada penelitian utama. Penelitian utama dilakukan untuk mengetahui waktu, suhu, pH, dan volume substrat yang optimal untuk membuat hidrolisat protein kerang serta untuk mengetahui profil asam amino dari hidrolisat protein yang dihasilkan.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa fase log khamir laut yaitu pada hari ke-3 mempengaruhi hidrolisis protein kerang darah. Substrat kerang darah yang efektif untuk dihidrolisis proteinnya adalah substrat dalam bentuk supernatan dengan volume optimal sebanyak 131 mL dengan penambahan volume khamir laut sebanyak 40 mL (3:1); (v:v). Kapasitas hidrolisis protein kerang darah oleh khamir laut yang dipanen pada fase log didapatkan kondisi yang optimal yaitu pada pH 13; suhu 44°C selama 80 menit dengan menghasilkan asam amino sebanyak 17 macam yang terdiri dari arginin, aspartat, sistin, glutamat, glisin, histidin, lisin, serin, treonin, alanin, isoleusin, leusin, metionin, fenilalanin, prolin, tirosin, dan valin. Hasil kadar asam amino hidrolisat protein kerang darah yang dihasilkan lebih tinggi yaitu sebesar 12.623385 µg/g dibandingkan dengan sebelum dihidrolisis yaitu sebesar 10.382544 µg/g. Asam amino dengan sifat hidrofilik mengalami kenaikan setelah dibuat hidrolisat protein kerang darah sementara asam amino jenis hidrofobik mengalami penurunan.

KATA PENGANTAR

Segala puji bagi Allah SWT yang telah memberikan nikmat yang begitu luas dan salah satu kenikmatan tersebut adalah terselesaikannya laporan skripsi ini yang berjudul Pengaruh Khamir Laut Jenis Campuran yang Dipanen pada Fase Log dalam Menghidrolisis Protein Kerang Darah (*Anadara granosa*) dapat terselesaikan dengan lancar. Laporan Praktek Kerja Lapang (PKL) ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Perikanan (S.Pi) di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang.

Terselesaikannya skripsi ini juga tidak luput dari orang-orang yang telah memotivasi penulis, oleh karena itu penulis juga mengucapkan terima kasih kepada kedua orang tua tercinta yang selalu memberikan doa, dukungan dan banyak lainnya sehingga memberikan semangat kepada penulis untuk menyelesaikan laporan ini, kepada dosen pembimbing Prof. Ir. SUKOSO, M.Sc. Ph.D dan Dr. Ir. MUHAMAD FIRDAUS, MP yang telah membagikan ilmunya dan juga membimbing dengan sabar dari awal penelitian sampai terselesaikannya laporan ini. Kepada Dr. Ir. Hartati Kartikaningsih, MS dan Dr. Ir. Dwi Setijawati, M.Kes sebagai dosen penguji yang banyak memberikan masukan dan saran. Terimakasih juga penulis sampaikan kepada teman-teman FOKSI, teman-teman THP 2008, dan juga penulis sampaikan kepada teman-teman yang sudah seperti keluarga dekat (yendi, ira, putri, veni, vega, anita, ester, dan nana) yang ikut membantu dan memberikan semangat.

Malang, September 2012

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR PENGESAHAN	i
RINGKASAN	ii
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR GAMBAR	vi
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
1. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	5
1.4 Hipotesa Penelitian	5
1.5 Kegunaan Penelitian	5
1.6 Tempat dan Waktu Penelitian.....	5
2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Kerang Darah.....	6
2.1.1 Biologi Kerang Darah	6
2.1.2 Kandungan Kimia Kerang Darah	7
2.1.3 Habitat dan Penyebaran	8
2.2 Khamir Laut.....	9
2.2.1 Morfologi Khamir Laut.....	9
2.2.2 Karakteristik dan Isolasi Khamir Laut	9
2.2.3 Komposisi Kimia Khamir Laut	11
2.2.4 Potensi Bioteknologi Khamir Laut.....	11
2.3 Protease.....	12
2.4 Protein dan Asam Amino.....	14
2.5 Hidrolisat Protein.....	18
2.5.1 Pengertian dan Manfaat Hidrolisat Protein	18
2.5.2 Teknologi Hidrolisat Protein	20
2.5.3 Hidrolisat Protein dengan Biokatalisator Khamir Laut.....	21
3. METODE PENELITIAN	
3.1 Materi Penelitian	23
3.1.1 Bahan dan Alat Penelitian.....	23
3.2 Metode Penelitian	23
3.3 Prosedur Penelitian.....	24
3.3.1 Penelitian Pendahuluan	24
3.3.2 Penelitian Utama.....	31

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Penelitian Pendahuluan.....	34
4.1.1 Pertumbuhan Khamir Laut	34
4.1.2 Bentuk Substrat Terbaik dan Volume Optimal Khamir Laut	37
4.2 Penelitian Utama	40
4.2.1 Waktu Optimal Khamir Laut dalam menghidrolisis Protein Kerang Darah	40
4.2.2 Suhu Optimal Khamir Laut dalam menghidrolisis Protein Kerang Darah	41
4.2.3 pH Optimal Khamir Laut dalam menghidrolisis Protein Kerang Darah	43
4.2.4 Volume Substrat Optimal Kerang Darah	44
4.2.5 Profil Asam Amino	45

5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan	52
5.2 Saran	52

DAFTAR PUSTAKA.....	53
----------------------------	-----------

LAMPIRAN.....	58
----------------------	-----------



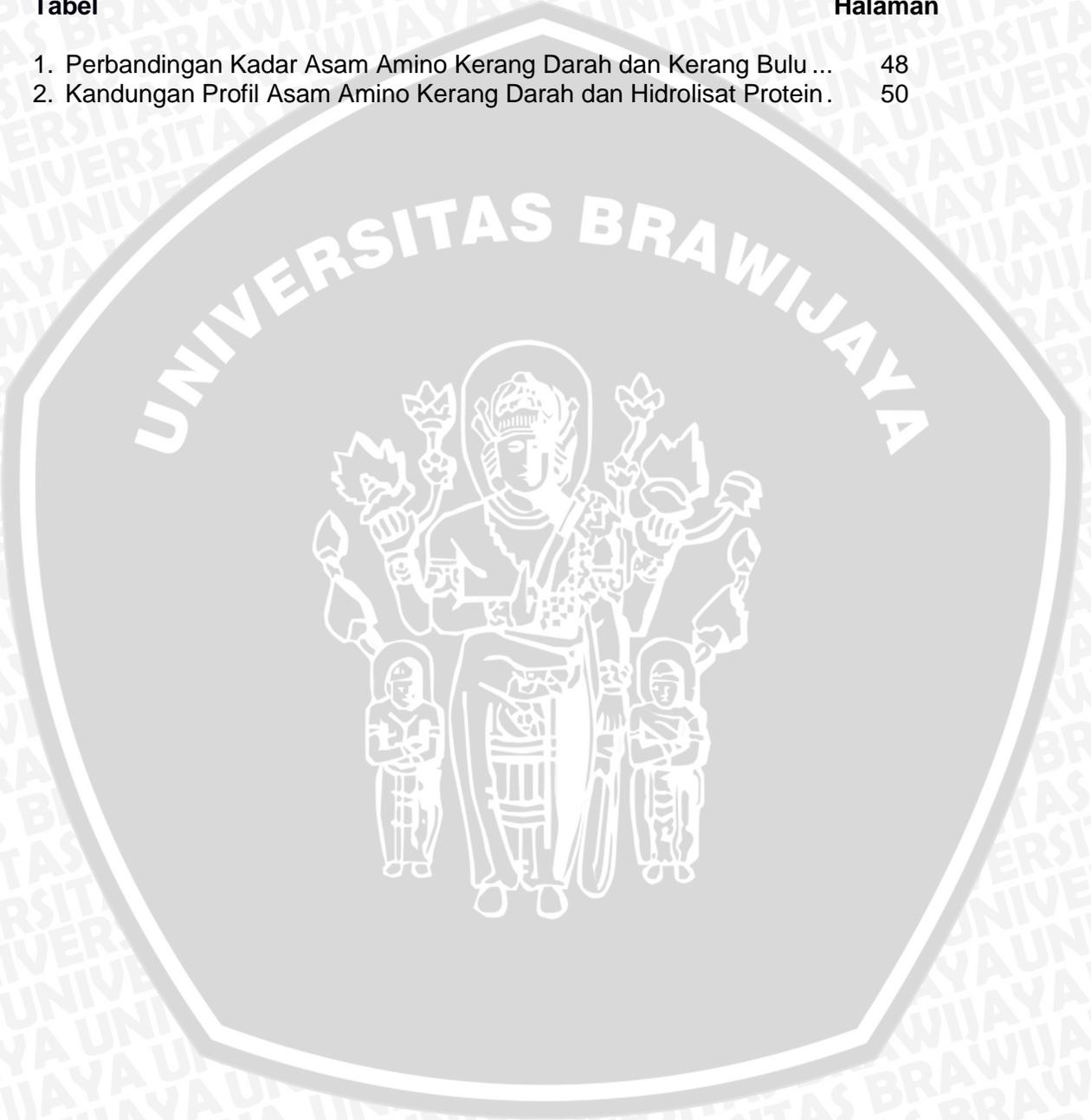
DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Kerang Darah (<i>Anadara granosa</i>)	7
2. Skema Kerja Pembuatan Hidrolisat Protein Percobaan I	28
3. Skema Kerja Pembuatan Hidrolisat Protein Percobaan II	30
4. Kekeruhan Khamir Laut pada Berbagai Tingkat Pengenceran dan Lama Kultur.....	34
5. Mikrograf Kepadatan Khamir Laut dalam Berbagai Lama Kultur	36
6. Derajat Hidrolisis Protein Kerang Darah dalam Berbagai Volume Khamir Laut	39
7. Derajat Hidrolisis Protein Kerang Darah dalam Berbagai Waktu Hidrolisis	40
8. Derajat Hidrolisis Protein Kerang Darah dalam Berbagai Suhu Hidrolisis.....	42
9. Derajat Hidrolisis Protein Kerang Darah dalam Berbagai pH Hidrolisis.....	43
10. Derajat Hidrolisis Protein Kerang Darah dalam Berbagai Volume Substrat	44
11. Kromatogram Profil Asam Amino Kerang Darah	46
12. Kromatogram Profil Asam Amino Hidrolisat Protein Kerang Darah ...	46
13. Standart Kromatogram Profil Asam Amino.....	47



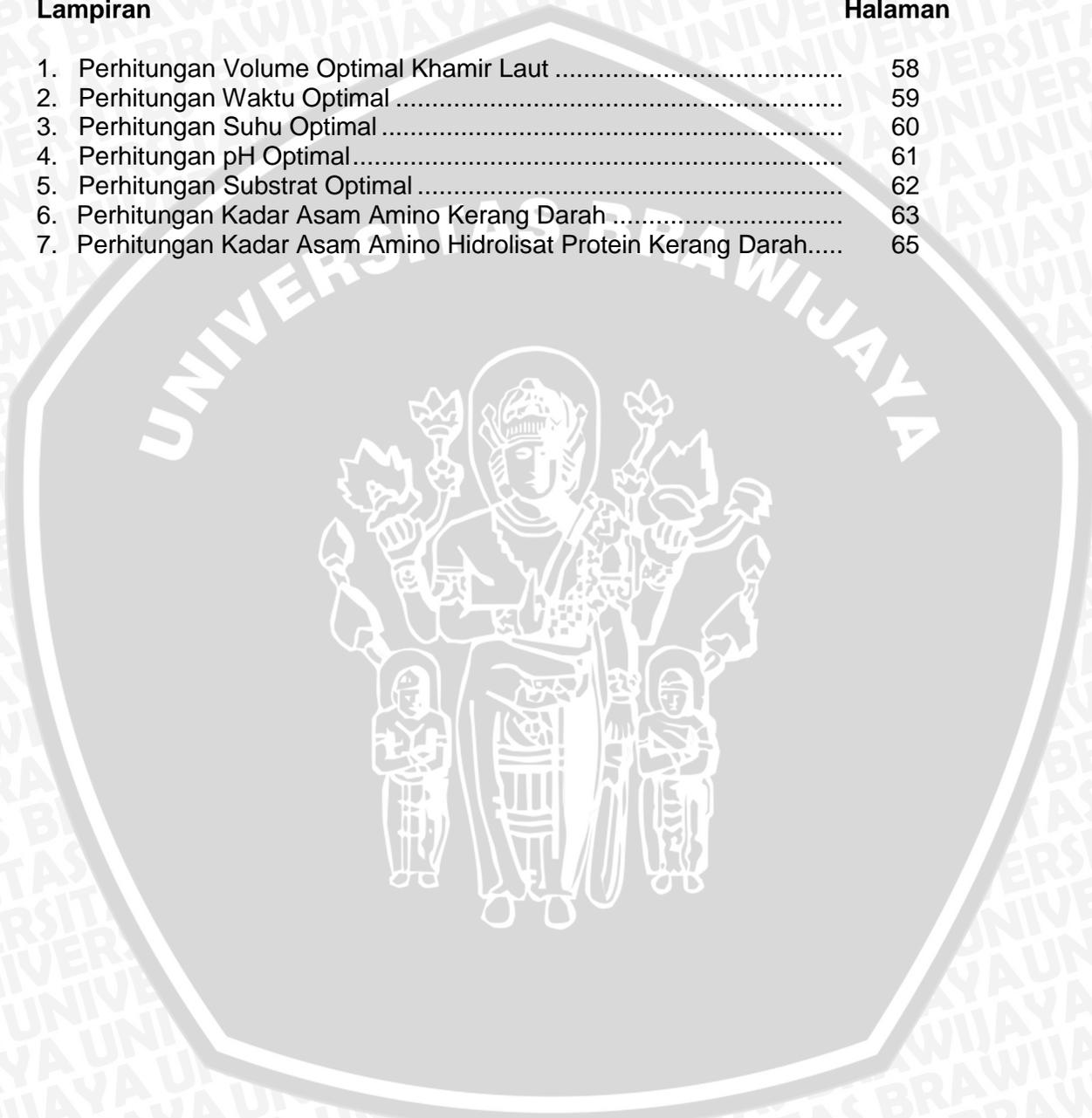
DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Perbandingan Kadar Asam Amino Kerang Darah dan Kerang Bulu ...	48
2. Kandungan Profil Asam Amino Kerang Darah dan Hidrolisat Protein.	50



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Perhitungan Volume Optimal Khamir Laut	58
2. Perhitungan Waktu Optimal	59
3. Perhitungan Suhu Optimal	60
4. Perhitungan pH Optimal.....	61
5. Perhitungan Substrat Optimal	62
6. Perhitungan Kadar Asam Amino Kerang Darah	63
7. Perhitungan Kadar Asam Amino Hidrolisat Protein Kerang Darah.....	65



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Peran protease sangat penting dalam bidang pangan maupun non pangan karena aplikasinya sangat luas. Industri pengguna protease diantaranya ialah industri deterjen, kulit, tekstil, makanan, pengolahan susu, farmasi, makanan, bir, film, limbah dan hidrolisat protein (Moon dan Parulekar 1993). Pemanfaatan protease dalam industri pangan diantaranya adalah untuk mengurangi kekeruhan dalam industri bir, mengurangi gluten pada industri roti, untuk menggumpalkan susu pada industri keju dan sebagai bahan penghidrolisis (Putranto 2006). Beberapa data menunjukkan bahwa protease yang digunakan di seluruh dunia dari total enzim yang diperjualbelikan mencapai 60% (Akhdia 2003). Protease yang banyak dimanfaatkan oleh industri-industri tersebut adalah protease yang aktif pada pH netral sampai basa yang disebut dengan alkalin protease (Tagaki dan Kurmar 1999).

Sumber protease dari tumbuhan dan hewan tidak mampu untuk memenuhi kebutuhan protease dunia sehingga menunjukkan bahwa protease dari mikroba akan lebih produktif dalam pemenuhan kebutuhan protease dunia. Selain itu, protease mikroba relatif mudah diproduksi dalam skala besar (Rao *et al.* 1998). Menurut Balqis (2007) mikroorganisme seperti bakteri, kapang, khamir, virus dan cacing parasitik mengandung protease yang dapat diisolasi.

Kultur khamir dapat menghasilkan berbagai enzim baik yang bekerja terhadap karbohidrat, lemak, protein dan enzim lainnya. Selama proses pertumbuhannya, sel khamir menghasilkan senyawa seperti nukleotida, asam amino, *unidentified growth factor* yang menstimulir pertumbuhan enzim – enzim pencernaan (Made *et al.* 1996).

Khamir laut diketahui mengandung alkalin protease seperti *Candida lipolytica*, *Yarrowia lipolytica* dan *Aureobasidium pullulans* (Donaghy dan McKay 1993). Ping *et al.* (2006) mengungkapkan bahwa khamir laut strain 10 yang diisolasi dari sedimen laut dekat Qingdao, China menghasilkan aktifitas alkalin protease yang tinggi. Ni *et al.* (2008) juga mengungkapkan bahwa khamir laut strain HN2-3 bisa menghasilkan sejumlah besar alkalin protease.

Adanya penemuan yang mengungkapkan bahwa khamir laut mengandung alkalin protease ini menjadikan peluang bagi Indonesia yang memiliki daerah perairan luas dalam penyediaan khamir laut sebagai sumber alkalin protease, namun potensi penyediaan khamir laut itu sendiri masih sangat sedikit pemanfaatannya sehingga perlu adanya pengoptimalan pemanfaatan khamir laut. Pemanfaatan khamir laut sebagai sumber protease pada penelitian terdahulu telah dilakukan oleh Khotim (2011) yang mengkultur khamir laut selama 10 hari dan dari hasil penelitiannya menunjukkan bahwa sel khamir laut yang diperoleh tidak banyak. Hasil tersebut menunjukkan bahwa perlu adanya penelitian lebih lanjut untuk menentukan fase pertumbuhan khamir laut dalam menghasilkan sel khamir laut yang banyak atau fase log khamir laut. Pemanfaatan khamir laut pada penelitian terdahulu telah diaplikasikan pada pembuatan hidrolisat protein ikan (HPI) dengan substrat dari ikan peperek. Hal tersebut menjadikan peluang bagi hasil perikanan lainnya yang mengandung banyak protein namun kurang ekonomis yang kemudian dijadikan produk baru dengan memanfaatkan khamir laut sebagai sumber alkalin protease.

Hasil perikanan yang kurang ekonomis yaitu seperti kerang khususnya kerang darah (*Anadara granosa*). Menurut Porsepwandi (1998) salah satu kelompok hasil laut yang belum banyak dieksplorasi adalah kerang-kerangan. Kerang

merupakan salah satu komoditi hasil perikanan yang memiliki nilai gizi tinggi. Daging kerang mempunyai prospek yang baik bagi penambahan konsumsi protein di Indonesia, khususnya kerang darah. Namun pemanfaatan kerang darah hanya dimanfaatkan sebagai makanan sehari-hari, seperti lauk, sate, saos yang kurang ekonomis sehingga belum bisa memberi nilai tambah (*added value*) dan *marketable*. Peningkatan nilai ekonomi kerang darah ini bisa melalui pemanfaatannya sebagai produk baru yang lebih memiliki banyak keunggulan dan manfaat seperti hidrolisat protein.

Hidrolisat protein hasil perikanan dapat dimanfaatkan sebagai bahan tambahan pangan untuk memperkaya protein dan nilai gizi baik makanan maupun minuman. Hal tersebut dikarenakan tingkat kelarutan dan pencernaan HPI cukup tinggi (Giyatmi 2001). Pigott dan Tucker (1990) telah memanfaatkan HPI sebagai bahan fortifikasi dan suplemen seperti pada pembuatan es krim, agar-agar, sebagai pengemulsi, pengembang serta bahan pengisi. Sementara itu Sachimidi *et al.* (1994) memanfaatkan hidrolisat protein ikan sebagai diet khusus, seperti kasus *pancreatitis*, sindrom akibat susah buang air besar dan, alergi makanan.

Belum adanya penelitian mengenai kerang darah sebagai substrat pembuatan hidrolisat protein dengan memanfaatkan khamir laut yang dipanen pada fase logaritmiknya maka perlu adanya penelitian mengenai hal tersebut. Dari paparan yang telah dijelaskan maka diperlukan kajian yang membahas tentang pemanfaatan khamir laut yang mengandung alkalin protease sebagai biokatalisator dalam hidrolisat protein kerang darah.

1.2 Rumusan Masalah

Alkalin protease telah menunjukkan banyak aplikasinya dalam perindustrian baik pangan maupun non pangan, namun penyediaan sumber dari alkalin protease tersebut tidak akan terpenuhi jika hanya terbatas pada sumber dari tanaman dan hewan, sehingga sumber dari mikroorganisme sangat potensial karena relatif mudah diproduksi dalam skala besar.

Adanya penemuan yang mengungkapkan bahwa khamir laut mengandung alkalin protease dengan aktifitas yang cukup tinggi maka bagi negara yang memiliki daerah perairan yang luas seperti Indonesia sangat berpeluang dalam penyediaan alkalin protease dari khamir laut. Pemanfaatan khamir laut sebagai sumber protease pada penelitian terdahulu telah dilakukan dengan mengkultur khamir laut selama 10 hari dan dari hasil penelitiannya menunjukkan bahwa sel khamir laut yang diperoleh tidak banyak. Hasil tersebut menunjukkan bahwa perlu adanya penelitian lebih lanjut untuk menentukan waktu panen yang tepat yaitu pada fase log khamir laut. Pemanfaatan khamir laut pada penelitian terdahulu telah diaplikasikan pada pembuatan hidrolisat protein ikan (HPI) dengan substrat dari ikan peperek. Substrat dari hasil perikanan dipilih sebagai hidrolisat protein karena memiliki tingkat kelarutan dan pencernaan yang cukup tinggi. Hasil perikanan lainnya yang kurang ekonomis seperti kerang-kerangan belum banyak dimanfaatkan khususnya kerang darah. Oleh karena itu perlu adanya penelitian mengenai pemanfaatan khamir laut yang mengandung alkalin protease sebagai biokatalisator dalam pembuatan hidrolisat protein kerang darah.

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan pengaruh khamir laut yang dipanen pada fase log dalam menghidrolisis protein kerang darah (*Anadara granosa*).

1.4 Hipotesa Penelitian

Hipotesis dari penelitian ini adalah khamir laut yang dipanen pada fase log mempengaruhi hidrolisis protein kerang darah (*Anadara granosa*).

1.5 Kegunaan Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai pengaruh khamir laut yang dipanen pada fase log dalam menghidrolisis protein kerang darah (*Anadara granosa*).

1.6 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Kimia Organik Fakultas MIPA, dan Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang Bulan Maret sampai Juni 2012.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kerang Darah

2.1.1 Biologi Kerang Darah

Klasifikasi kerang darah menurut Ramadhan (2005) adalah Kingdom: Animalia, Phylum : Mollusca, Class : Bivalvia, Subclass : Pterimorpha, Order : Ancoida, Family : Anncradae, Genus : Anadara, Spesies : *Anadara granosa*.

Anadara granosa memiliki bentuk bulat kipas, agak lonjong, terdiri dari dua belahan yang sama (simetris). Bagian dalam halus dengan warna putih mengkilat. Warna dasar kerang putih kemerahan (merah darah) dan bagian dagingnya merah. Ukuran lebar cangkang dapat mencapai 4 cm (Umbara dan Suseno, 2006). Menurut Nurjanah *et al.* (2005) ciri-ciri kerang darah adalah mempunyai 2 keping cangkang yang tebal, *elips* dan kedua sisi sama, cangkang berwarna putih ditutupi periostrakum yang berwarna kuning kecoklatan sampai coklat kehitaman. Ukuran kerang darah dewasa 6-9 cm.

Disebut kerang darah karena kelompok kerang ini memiliki pigmen darah merah/hemoglobin yang disebut *bloody cockles*, sehingga kerang ini dapat hidup pada kondisi kadar oksigen yang relatif rendah, bahkan setelah dipanen masih bisa hidup walaupun tanpa air. Tidak mengherankan jika pedagang menjual kerang dalam keadaan hidup dengan ciri cangkang tertutup rapat bila terkena sentuhan. Kerang yang mati cangkangnya agak terbuka dan sedikit menganga yang diikuti oleh bau segar yang perlahan-lahan berganti dengan bau busuk (amoniak) (Pengelolaan Sumber Daya Perikanan, Kelautan dan Lingkungan (PSPKL) 2004).

Gambar kerang darah dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Kerang Darah (*Anadara granosa*)

2.1.2 Kandungan Kimia Kerang Darah

Komposisi kimia kerang sangat bervariasi tergantung pada spesies, jenis kelamin, umur, dan habitat. Pada umumnya kerang kaya akan asam suksinat, asam sitrat, asam glikolat yang erat kaitannya dengan cita rasa dan memberikan energi sebagai kalori. Selain itu kerang juga mengandung enzim tiaminase dalam jumlah yang besar sehingga dapat merusak vitamin B1 bila dikonsumsi dalam keadaan mentah. Tiaminase dapat diinaktifkan dengan pemanasan atau pemasakan (*Overseas Fishery Cooperation Foundation (OFCF) 1987*).

Komposisi kimia kerang darah mengandung protein 9-13 %, lemak 0-2 %, glikogen 1-7 %, dan memiliki nilai kalori 80 kalori dalam 100 gram daging segar (*Budiyanto et al. 1990*). Nurjanah *et al.* (2005) melaporkan bahwa kerang darah mentah terdiri dari protein 19,48 %, lemak 2,50 %, abu 2,24 %, dan air 74,37 %. Komposisi kimia untuk kerang darah mentah dan rebus berbeda nilainya yaitu terjadi penurunan kadar air. Penurunan kadar air disebabkan oleh proses pemanasan (perebusan) yang menyebabkan terlepasnya air bebas dari bahan. Bahan yang mengandung protein seperti kerang akan mengalami denaturasi dan koagulasi. Berdasarkan berat kering pada kerang yang telah direbus mengalami penurunan

kadar protein dan abu sedangkan kadar lemak meningkat. Peningkatan kadar lemak merupakan perhitungan proporsional yang disebabkan oleh turunnya kadar protein dan abu. Penurunan kadar protein dan abu dapat disebabkan oleh terlarutnya komponen tersebut pada saat direbus. Komponen tersebut terdiri dari protein yang bersifat larut air terutama sarkoplasma.

2.1.3 Habitat dan Penyebaran

Kerang darah (*Anadara granosa*) terdapat di pantai laut pada substrat lumpur berpasir dengan kedalaman 10 sampai 30 meter yang hidup dengan cara membenamkan diri di pantai-pantai berpasir (Oemarjati 1990). Menurut PSPKL (2004) kerang darah banyak ditemukan di muara sungai pada substrat yang berlumpur dengan tofografi pantai yang landai sampai kedalaman 20 meter. Kerang darah bersifat infauna yaitu hidup dengan cara membenamkan diri di bawah permukaan lumpur di perairan dangkal.

Kerang darah terdistribusi dari Australia, *Tropical Indo-West Pacific, Red Sea, South China Sea*, Vietnam, China, Hong Kong (*Xianggang*), Thailand, Filipina, *New Caledonia*, Jepang, dan Indonesia yang tersebar di kawasan pesisir pantai (Nurdin *et al.* 2006). Kerang (bivalvia) tersebar luas di seluruh perairan Indonesia seperti: Bengkulu, Jawa, Nusa Tenggara Timur, Kalimantan Barat, Kalimantan Selatan, Kalimantan Timur, Sulawesi Selatan, Maluku, dan Irian Jaya (Djamali 1998).

2.2 Khamir Laut

2.2.1 Morfologi Khamir Laut

Khamir adalah organisme uniseluler dari golongan jamur. Bentuk khamir dapat berbentuk bulat oval, seperti jeruk, silindris, segitiga, memanjang seperti miselium sejati atau miselium palsu, oval yaitu bulat panjang dengan salah satu ujung runcing, segitiga melengkung. Khamir adalah mikroorganisme bersel tunggal dengan ukuran antara 5 dan 20 mikro. Biasanya berukuran 5 sampai 10 kali lebih besar dari bakteri. Ukuran dan bentuk sel dalam kultur yang sama mungkin berbeda karena pengaruh perbedaan umur dan kondisi lingkungan selama pertumbuhan. Sel muda mungkin berbeda bentuknya dari yang tua karena adanya proses *ontogeny* yaitu perkembangan individu sel. Khamir yang berbentuk apikulat umumnya berasal dari tunas berbentuk bulat sampai bulat oval yang terlepas dari induknya, kemudian tumbuh dan membentuk tunas sendiri (Jay 1992).

Seperti bakteri, sel-sel khamir mempunyai lapisan dinding luar yang terdiri dari polisakarida kompleks dan di bawahnya terletak membran sel. Sitoplasma mengandung suatu inti yang bebas (*discrete nucleus*) dan bagian yang berisi sejumlah besar cairan disebut vakuola. Bagian struktur yang terlihat adalah dinding sel, sitoplasma, vakuola, butir lemak, albumin, dan pati. Khamir tidak bergerak karena tidak mempunyai struktur tambahan di bagian luarnya seperti flagella. Beberapa jenis khamir membentuk kapsul di sebelah luar (Walker 1998).

Khamir bersifat kemoorganotrop berproduksi seksual dengan spora dan aseksual dengan pertunasan, pembelahan atau kombinasi keduanya (Kreger, 1984). Khamir termasuk fungi, tetapi dibedakan dari kapang karena bentuknya yang uniseluler. Reproduksi vegetatif pada khamir terutama pada pertunasan, sebagai sel tunggal, khamir tumbuh dan berkembang biak dengan filamen, khamir berbeda

dengan ganggang karena tidak dapat melakukan fotosintetis dan berbeda dengan protozoa karena mempunyai dinding sel yang kuat, khamir mudah dibedakan dari bakteri karena ukurannya lebih besar dan morfologinya berbeda (Fardiaz, 1992).

2.2.2 Isolasi Khamir Laut

Khamir laut pertama di isolasi oleh Fischer pada tahun 1886 sampai 1894. Pada tahun 1976 dilaporkan bahwa isolasi khamir laut dari Biscayne Bay Florida diperoleh 179 isolat terdiri dari khamir berspora (*Debaryomyces kloekeri*, *Hansenula anomala*, dan *Saccaromyces fructuum*) dan Khamir tidak berspora (*Candida*, *Rhodotorula*, *torulopsis*, dan *Cryptococcus*). Tahun 1979 telah teridentifikasi 177 khamir dari perairan laut, sebagian merupakan khamir obligat (benar-benar habitatnya di perairan laut) (Reed 1991).

Nagahama *et al.* (2001) melaporkan ada 99 strain berhasil diisolasi dari perairan laut samudra Pasifik. 40 strain diantaranya merupakan khamir laut merah (*rhodotorula* dan *Sporobolomyces*) yang 81,5 % didapatkan dari binatang laut dan 10,6% dari sedimen. Didapat distribusi khamir laut yang bersifat halotoleran dan fermentatif perairan sungai dan laut di Jepang, didapat batas toleransi NaCl khamir laut 2,3-2,5 M dan khamir sungai 1,5-1,9 M. Kemampuan fermentasi pada kadar garam 2,5 M adalah 17-31% pada khamir laut dan 0-4% pada khamir sungai. Secara umum jumlah koloni makin menurun dengan naiknya tekanan osmosis dan meningkat dengan makin banyaknya karbon organik. Menurut Wiyanto dan Sukoso (2003) dari *bioprospecting* khamir laut melalui pendekatan fisiologis dan isolasi DNA total yang diisolasi dari Laut Jawa didapatkan 3 jenis khamir laut dan 1 diantaranya (diberi nama tentatif KLS-LJ1) dan dilakukan uji fisiologis dan isolasi DNA total.

2.2.3 Komposisi Kimia Khamir Laut

Kandungan kimia dari khamir laut yaitu protein yang mencapai 25,1% dengan asam amino seimbang ; kaya akan asam lemak tak jenuh (Kinsella, 1987) serta vitamin mineral (Pelczar dan Reid, 1965). Dinding sel terdiri dari glukan / selulosa khamir (30 - 35 %), mannan (30%), lemak (8,5 – 13%), protein (6 – 8%) dan kitin (1 - 2%) dari berat kering sel (Fardiaz 1992).

Kandungan nutrisi khamir laut yang telah diisolasi dari laut Jawa diketahui memiliki kualitas nutrisi yang baik yaitu bahan kering oven 71.85 %, protein 28.29%, serat kasar 0.950, lemak kasar 0.340%, BETN (Bahan Ekstrak Tanpa Nitrogen) 4.330 % dan abu 66.09 %. Disamping tingginya kandungan protein khamir laut yang mencapai 28,29 %, secara umum protein yang terkandung dari mikroba termasuk yeast banyak mengandung valin, isoleusin, triptofan, lisin dan threonin (Febriani 2001). *Protein Efisiensi Rasio* (PER) sel khamir berkisar 2,02 dapat ditingkatkan sampai dengan 2,8 dengan penambahan 0,5% methionin (Kinsella 1987).

2.2.4 Potensi Bioteknologi Khamir Laut

Khamir laut sebagaimana khamir umumnya memiliki potensi bioteknologi (fermentasi) yang sangat besar. Ada dua potensi besar dari khamir khususnya khamir laut. Pertama, khamir kebanyakan hidup pada substrat yang memiliki nilai nutrisi yang sangat tinggi (Adams dan Moss 2000). Kebanyakan khamir akan memiliki komposisi nutrisi yang kompleks dan lengkap pula termasuk vitamin dan asam amino (Kinsella 1987). Potensi yang kini dikembangkan dalam menghasilkan alternatif sumber nutrisi pangan bagi manusia (misal: protein sel tunggal). Potensi kedua adalah setelah penemuan Pasteur, metabolisme alami dan khamir menjadi salah satu bagian penting dalam perkembangan teknik fermentasi

bahan pangan, dimana tidak diragukan bahwa fermentasi di masa mendatang akan terus mendapat peningkatan perhatian sebagai proses pengawetan dan pengolahan bahan pangan yang dapat menghasilkan nilai gizi tinggi (Desrosier 1988).

Secara umum, pengaruh yang diinginkan dari aktifitas mikrobia (termasuk khamir) disebabkan oleh aktifitas biokimianya. Enzim mikrobia akan memecah karbohidrat, protein, lemak, atau komponen makanan lainnya sehingga dapat meningkatkan daya cerna dan daya serap produk yang dihasilkan untuk manusia. Sebagai hasil dari pertumbuhan dan metabolismenya, beberapa bahan metabolit dihasilkan oleh mikrobia dalam bahan makanan yang mereka fermentasi, seperti asam organik, alkohol, aldehid, dan banyak lainnya. Sebagai tambahan, selain enzim dan metabolit, mikrobia dalam fermentasi juga menghasilkan peningkatan biomassa selnya, yang akan mampu meningkatkan nilai nutrisionalnya (contoh: ekstrak khamir laut) (Adams dan Nout 2001).

Fermentasi oleh khamir dan mikroba lainnya pada dasarnya terjadi pada substrat organik yang sesuai dengan membutuhkan tersedianya karbohidrat, protein, lemak, mineral dan zat-zat gizi di dalam pangan yang asli. Nampak bahwa mikrobia pertama-tama menyerang karbohidrat, kemudian protein dan berikutnya lemak. Bahkan terdapat tingkatan penyerangan terhadap karbohidrat, yang pertama gula kemudian alkohol, kemudian asam (Desrosier 1988). Fermentasi biasanya dilakukan dengan menggunakan kultur murni yang dihasilkan di Laboratorium, namun ada pula yang tidak menggunakan kultur murni untuk fermentasi sebagai starter, misalnya pada pembuatan tempe (Winarno 2004).

Ping *et al.* (2006) mengungkapkan bahwa khamir laut strain 10 yang diisolasi dari sedimen laut dekat Qindao, China menghasilkan alkaline protease yang tinggi sehingga memiliki potensi untuk dijadikan bahan penghidrolisis. Ni *et al.* (2008) juga

mengungkapkan bahwa strain HN2-3 bisa menghasilkan sejumlah besar ekstraselular alkalin protease strain *Aureobasidium pullulans*.

2.3 Protease

Protease adalah enzim yang dapat menghidrolisis ikatan peptida pada protein. Molekul yang berfungsi sebagai unit penyusun polimer protein adalah asam amino yang terangkai melalui ikatan peptida. Jumlah asam amino penyusun protein puluhan sampai jutaan (Nuraini 2002). Protease merupakan enzim yang mengkatalisasi pemecahan ikatan peptida dalam peptida, polipeptida dan protein dengan menggunakan reaksi hidrolisis menjadi molekul-molekul yang lebih sederhana seperti peptida rantai pendek dan asam amino (Naiola dan Widyastuti 2002).

Protease dapat diisolasi dari tumbuhan (papain dan bromelin), hewan (tripsin, kimotripsin, pepsin, dan renin), mikroorganisme seperti bakteri, kapang, virus, dan cacing parasitik (Balqis 2007). Ketidak mampuan sumber protease dari tumbuhan dan hewan untuk memenuhi kebutuhan protease dunia, telah menunjukkan bahwa meningkatnya ketertarikan pada protease mikroba. Selain itu, protease mikroba relatif mudah diproduksi skala besar dibanding protease dari hewan dan tumbuhan. Protease mikroba mencapai 40% dari total penjualan enzim di dunia (Rao *et al.* 1998).

Protease dibagi menjadi dua kelompok besar yaitu eksopeptidase dan endopeptidase. Eksopeptidase dapat dibagi lagi menjadi karboksi (ekso) peptidase dan amino (ekso) peptidase, yang berturut-turut memotong peptida dari arah gugus karboksil terminal dan gugus amino terminal. Endopeptidase memecah protein dan ikatan peptida dari dalam (Muchtadi *et al.* 1992).

Hidrolisis ikatan peptida adalah reaksi penambahan-penghilangan, dimana protease bertindak sebagai nukleofili atau bereaksi dengan membentuk satu molekul air (Bauer et al. 1996). Secara umum nukleofili membentuk intermediet tetrahedral dengan atom karbon karbonil pada ikatan peptida. Satu gugus amina dilepaskan dan dikeluarkan dari sisi aktif, yang digantikan secara bersamaan dengan satu molekul air. Pada protease tertentu, adisi enzim-asil dapat dibentuk. Intermediate tetrahedral kedua akhirnya dibentuk dan menghasilkan produk karboksilat, proton dan enzim bebas yang diregenerasi (Moran et al. 1994).

2.4 Protein dan Asam Amino

Protein merupakan makromolekul yang paling melimpah di dalam sel. Unit penyusunnya adalah asam amino yang berikatan secara kovalen untuk menghubungkan molekul-molekul menjadi rantai. Apabila protein dihidrolisis dengan asam, alkali, atau enzim akan dihasilkan campuran asam-asam amino (Winarno 1997).

Asam amino biasanya larut dalam air dan tidak larut dalam pelarut organik non polar yaitu eter, aseton, dan kloroform (Sitompul 2004). Berdasarkan sifat kimia rantai sampingnya, asam amino dapat dibagi menjadi empat kelompok, yaitu asam amino yang bersifat basa lemah, asam lemah, hidrofilik jika polar dan hidrofobik jika nonpolar (Almatsier 2006).

Asam amino dibagi dalam dua kelompok utama jika ditinjau dari segi pembentukannya, yaitu asam amino esensial dan nonesensial. Asam amino esensial tidak dapat diproduksi oleh tubuh sehingga harus disuplai lewat makanan, sedangkan asam amino nonesensial dapat diproduksi dalam tubuh. Berbagai jenis asam amino menyatu dalam ikatan peptida menghasilkan protein. Asam-asam

amino esensial yang dibutuhkan tubuh manusia ialah histidin, isoleusin, leusin, lisin, metionin, arginin, phenilalanin, treonin, triptofan, dan valin, sedangkan asam-asam amino non esensial ialah alanin, asparagin, sistein, asam glutamat, glutamin, asam aspartat, glisin, hidrokisprolin, dan tirosin (Poedjiadi dan Supriyanti 2006).

Manfaat dari beberapa asam amino esensial adalah sebagai berikut:

- a. Asam amino histidin diperoleh dari hasil hidrolisis protein yang terdapat pada sperma suatu jenis ikan (kaviar). Histidin berfungsi mendorong pertumbuhan dan memperbaiki jaringan tubuh yang rusak (Edison 2009). Asam amino ini juga bermanfaat baik untuk kesehatan radang sendi. Histidin merupakan asam amino yang esensial bagi perkembangan bayi, tetapi tidak diketahui pasti apakah dibutuhkan oleh orang dewasa (Linder 1992).
- b. Treonin dapat meningkatkan kemampuan usus dan proses pencernaan, mempertahankan keseimbangan protein, penting dalam pembentukan kolagen dan elastin, membantu fungsi hati, jantung dan sistem syaraf pusat serta mencegah serangan epilepsi (Harli 2008).
- c. Arginin adalah asam amino yang dibentuk di hati dan beberapa diantaranya terdapat dalam ginjal. Arginin bermanfaat untuk meningkatkan daya tahan tubuh atau produksi limfosit, meningkatkan pengeluaran hormon pertumbuhan (HGH) dan meningkatkan kesuburan pria (Linder 1992).
- d. Valin merupakan asam amino rantai bercabang yang berfungsi sebagai prekursor glukogenik. Valin sangat penting untuk pertumbuhan dan memelihara jaringan otot. Valin juga dapat memacu kemampuan mental. memacu koordinasi otot, membantu perbaikan jaringan yang rusak dan menjaga keseimbangan nitrogen (Harli 2008). Kekurangan asam amino ini dapat menyebabkan

kehilangan koordinasi otot dan tubuh menjadi sangat sensitif terhadap rasa sakit, panas dan dingin (Edison 2009).

- e. Metionin penting untuk metabolisme lemak, menjaga kesehatan hati, menenangkan syaraf yang tegang, mencegah penumpukan lemak di hati dan pembuluh darah arteri terutama yang mensuplai darah ke otak, jantung dan ginjal, penting untuk mencegah alergi, osteoporosis, demam rematik, dan detoksifikasi zat-zat berbahaya pada saluran pencernaan. Metionin memberikan gugus metal untuk sintesis kolin dan kreatinin. Metionin juga diperlukan tubuh untuk membentuk sistein (Edison 2009).
- f. Isoleusin diperlukan untuk pertumbuhan yang optimal, membantu dalam perbaikan jaringan yang rusak, perkembangan kecerdasan, mempertahankan keseimbangan nitrogen tubuh, pembentukan asam amino non esensial lainnya dan pembentukan hemoglobin serta menstabilkan kadar gula darah. Kekurangan isoleusin dapat memicu gejala hypoglycemia (Harli 2008).
- g. Leusin dapat memacu fungsi otak, menambah tingkat energi otot, membantu menurunkan kadar gula darah yang berlebihan, membantu penyembuhan tulang, jaringan otot dan kulit (terutama untuk mempercepat penyembuhan luka post-operative). Leusin juga berfungsi dalam menjaga sistem imun (Edison 2009).
- h. Fenilalanin merupakan prekursor tirosin. Fenilalanin diperlukan oleh kelenjar tiroid untuk menghasilkan tiroksin yang dapat mencegah penyakit gondok. Selain itu, fenilalanin juga berfungsi memproduksi epinefrin dan neropinefrin. Asam amino ini dipakai untuk mengatasi depresi juga untuk mengurangi rasa sakit akibat migrain, menstruasi dan arthritis, menghasilkan neropinephrine otak

yang membantu daya ingat dan daya hafal, serta mengurangi obesitas (Harli 2008).

- i. Lisin berfungsi sebagai bahan dasar antibodi darah, memperkuat sistem sirkulasi, mempertahankan pertumbuhan sel-sel normal bersama prolin dan vitamin C akan membentuk jaringan kolagen, menurunkan kadar trigliserida darah yang berlebih. Kekurangan lisin dapat menyebabkan mudah lelah, sulit konsentrasi, rambut rontok, anemia, pertumbuhan terhambat dan kelainan reproduksi (Edison 2009).
- j. Triptofan merupakan prekursor vitamin niasin dan pengantar syaraf serotonin. Triptofan dapat meningkatkan penggunaan dari vitamin B kompleks, meningkatkan kesehatan syaraf, menstabilkan emosi, meningkatkan rasa ketenangan dan mencegah insomnia (membantu anak yang hiperaktif), serta meningkatkan pelepasan hormon pertumbuhan (Linder 1992).

Manfaat dari beberapa asam amino non esensial adalah sebagai berikut:

- a. Asam glutamat dan asam aspartat dapat diperoleh masing-masing dari glutamin dan asparagin. Gugus amida yang terdapat pada molekul glutamin dan asparagin dapat diubah menjadi gugus karboksilat melalui proses hidrolisis asam atau basa. Asam glutamat bermanfaat untuk menahan konsumsi alkohol berlebih, mempercepat penyembuhan luka pada usus, meningkatkan kesehatan mental serta meredam depresi. Asam aspartat merupakan komponen yang berperan dalam biosintesis urea, prekursor glukonik dan prekursor pirimidin. Selain itu asam aspartat bermanfaat untuk penanganan pada kelelahan kronis dan peningkatan energi (Linder 1992).
- b. Glisin adalah asam amino yang dapat menghambat proses dalam otak yang menyebabkan kekakuan gerak seperti pada multiple sclerosis (Harli 2008).

- c. Alanin merupakan asam amino dengan gugus R nonpolar yang digunakan sebagai prekursor glukogenik dan pembawa nitrogen dari jaringan permukaan untuk ekskresi nitrogen (Linder 1992).
- d. Prolin adalah asam amino yang gugus R-nya nonpolar dan bersifat hidrofobik. Prolin memiliki gugus amino yang bebas dan membentuk struktur aromatik. Asam amino ini dapat diperoleh dari hasil hidrolisis kasein (Hawab 2007).
- e. Tirosin merupakan asam amino yang mempunyai gugus fenol dan bersifat asam lemah. Asam amino ini dapat diperoleh dari kasein, yaitu protein utama yang terdapat pada keju. Tirosin memiliki beberapa manfaat, yaitu dapat mengurangi stress, anti depresi serta detoksifikasi obat dan kokain (Linder 1992).
- f. Sistin dihasilkan bila dua molekul sistein berikatan kovalen sebagai jembatan disulfida atau ikatan disulfida. Sistin digunakan sebagai prekursor taurin. Sistin berperan pada struktur beberapa protein fungsional seperti pada hormon insulin, imunoglobulin sebagai antibodi dan keratin yang ditemukan pada rambut, kulit dan kuku (Hawab 2007).
- g. Serin merupakan komponen pada fosfolipid yang mengandung gugus hidroksil. Serin digunakan sebagai prekursor etanolamin dan kolin (Linder 1992).

2.5 Hidrolisat Protein

2.5.1 Pengertian dan Manfaat Hidrolisat Protein

Hidrolisat protein didefinisikan sebagai protein yang mengalami degradasi baik secara hidrolitik, fermentasi dan enzimatik dengan hasil akhir berupa senyawa protein yang lebih sederhana (Girinda 1993). Hidrolisat protein merupakan hasil

Hasil hidrolisis protein secara enzimatis berupa suatu hidrolisat yang mengandung peptida yang berat molekulnya lebih rendah dan asam amino bebas. Produk hidrolisat mempunyai kelarutan pada air yang tinggi, kapasitas emulsinya baik, kemampuan mengembang besar serta mudah diserap tubuh (Fox *et al.* 1991).

Pada umumnya hidrolisat protein digunakan untuk memperbaiki karakteristik berbagai produk pangan, sebagai penyedap rasa, sebagai lanjutan untuk isolasi asam amino, serta untuk pengobatan. Selain itu hidrolisat protein juga dapat disertakan sebagai menu para penderita gangguan pencernaan. Hidrolisat protein mempunyai peranan penting di dalam fortifikasi makanan dan minuman untuk memperkaya protein dan nilai gizi makanan, sehubungan dengan tingginya tingkat kelarutan dan pencernaan. Dalam perkembangannya, hidrolisat protein juga digunakan sebagai diet medis khusus seperti pada kasus *pancreatitis*, sindrom akibat kesulitan buang air besar, penyakit Crohn, dan alergi akibat makanan (Purbasari 2008).

Aplikasi produk hidrolisat protein salah satunya yaitu hidrolisat protein ikan (HPI) diantaranya digunakan dalam pengolahan bahan makanan tambahan dengan tujuan selain menambah sumber protein yang kaya dengan asam amino juga meningkatkan cita rasa produk (Kirk dan Othmer 1953). Diketahui bahwa hidrolisat protein ikan dapat dimanfaatkan sebagai bahan tambahan pangan untuk memperkaya protein dan nilai gizi baik makanan maupun minuman. Hal ini karena, tingkat kelarutan dan pencernaan HPI cukup tinggi (Giyatmi 2001). Pigott dan Tucker (1990), telah memanfaatkan HPI sebagai bahan fortifikasi dan suplemen seperti pada pembuatan es krim, agar-agar, sebagai pengemulsi, pengembang serta bahan pengisi. Sementara itu, Schmid *et al.* (1994) memanfaatkan hidrolisat protein ikan sebagai diet khusus, seperti kasus *pancreatitis*, sindrom akibat susah buang air

besar dan, alergi makanan. Dengan demikian diharapkan hidrolisat protein ini nantinya akan dikembangkan untuk menggantikan protein susu sapi yang pada sebagian orang atau bayi menimbulkan alergi.

2.5.2 Teknologi Hidrolisat Protein

Hidrolisat protein pertama kali diperkenalkan di Cina dan Jepang sekitar tahun 1990 dan merupakan hasil sampingan pembuatan Monosodium Glutamat (MSG). Setelah proses kristalisasi MSG selesai, tersisa asam amino yang telah dinetralkan dan dikeringkan. Hidrolisat protein dapat berbentuk cair, pasta, atau tepung yang bersifat higroskopis. Hidrolisat protein yang berbentuk cair mengandung 30 % padatan, sedangkan bentuk pasta mengandung 65 % padatan. Flavor yang khas dari hidrolisat tergantung dari komposisi asam amino bahan awalnya, misalnya hidrolisat yang dihasilkan dari gelatin relatif lebih manis rasanya karena kandungan glisinnya tinggi (Johnson dan Peterson 1994).

Perkembangan teknologi fermentasi ataupun bioteknologi pada pengolahan pangan telah mengarah pada penggunaan enzim-enzim proteolitik berstandar makanan (food grade) menggantikan penggunaan asam, basa, maupun prinsip autolysis (Mackie 1994). Proses pembuatan hidrolisat protein yang paling efisien adalah secara enzimatik karena enzim menghasilkan peptida yang tinggi dan kurang kompleks serta mudah dipecah-pecah. Di samping itu, hidrolisis menggunakan enzim dapat menghasilkan hidrolisat yang terhindar dari perubahan dan penghancuran produk secara hidrolitik, karena pada proses hidrolisis dengan asam maupun basa dapat merusak sebagian asam amino dan juga menghasilkan senyawa beracun seperti lysino-alanin (Lahl dan Braun 1994). Produk hasil hidrolisis

enzimatik lebih cerah, mengandung lebih rendah jumlah klorhidrin dan garam dan mempunyai rasa yang enak. Hidrolisat yang sempurna akan menghasilkan 18-20 jenis asam amino (Nakai dan Modler 1996).

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

Produk hidrolisat protein memiliki rasa pahit namun bila dibandingkan dengan kasein rasa pahit yang dimiliki termasuk ringan. Rasa pahit tersebut disebabkan oleh kecilnya ukuran peptida yang dihasilkan yaitu mencapai 6000 Da dengan rantai samping hidrofobik. Rasa pahit dapat dikurangi dengan mengontrol derajat hidrolisis sehingga dapat dihasilkan ukuran peptida yang lebih besar (Mackie 1994).

2.5.3 Hidrolisat Protein dengan Biokatalisator Khamir Laut

Khamir laut dari Pantai Jawa Timur yang diisolasi pada tahun 2003 dapat dimanfaatkan sebagai starter pada pembuatan hidrolisat protein ikan. Faharudin (2002) dan Waluyo (2004) telah melakukan penelitian aplikasi kultur khamir laut yang diisolasi dari pantai perairan Laut Jawa pada pembuatan (HPI) dari ikan peperek (*Leiognathus* sp.). Faharudin (2002) mencari konsentrasi khamir laut yang paling baik untuk ditambahkan sebagai starter pembuatan HPI serta melihat profil

asam amino dari perlakuan yang terbaik. Konsentrasi terbaik khamir laut yang ditambahkan adalah 30 ml untuk 100 gram bahan ikan (giling) pada suhu inkubasi 30°C selama 6 hari, dengan jumlah N-amino 0,63%; N-total 2,686%; serta non protein nitrogen 0,716%.

Waluyo (2004) menyatakan bahwa perlakuan terbaik untuk mendapatkan profil asam amino yang baik pada hidrolisat protein ikan (HPI) peperek adalah dengan konsentrasi kultur khamir laut 35 mL pada suhu inkubasi proses 25°C. Analisa profil asam lemak untuk perlakuan terbaik mendapatkan tujuh macam asam lemak ditambah EPA (*Eicosa Pentaeonic Acid*) dan DHA (*Decosa Hexaenoic Acid*). Penambahan kultur khamir laut mempengaruhi profil asam lemak yang didapatkan.



3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Bahan dan Alat Penelitian

Bahan yang digunakan untuk kultur khamir laut antara lain: air laut, akuades, gula, pupuk, dan khamir laut sebagai starter. Kerang darah (*Anadara granosa*) didapatkan dari pelabuhan Mayangan, Probolinggo, Jawa Timur sebagai bahan dasar pembuatan hidrolisat protein, bahan lain yang dibutuhkan yaitu PBS (*Phosphate Buffer Saline*) untuk merebus kerang darah. Bahan yang digunakan untuk analisa protein yaitu tablet kjeldhal, H_2SO_4 , TCA, KNa tartrat, larutan nesler dan akuades.

Alat-alat yang digunakan dalam pembuatan kultur khamir laut adalah botol gelas, gelas ukur, pipet volume, bola hisap, aerator, selang aerasi, kompor, dan timbangan digital. Peralatan yang digunakan untuk pembuatan hidrolisat protein kerang darah adalah timbangan digital, *beaker glass*, *waterbath*, blender, *waterbath shaker*, pipet volume, cuvet, dan sentrifuse. Peralatan yang digunakan untuk menguji kepadatan khamir laut adalah turbidimetri dan mikroskop. Peralatan yang digunakan untuk uji derajat hidrolisis yaitu labu kjeldahl, tabung reaksi, dan spektrofotometer.

3.2 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksploratif. Penelitian eksploratif adalah jenis penelitian yang berusaha mencari ide-ide atau hubungan-hubungan yang baru (Umar 1999). Metode ini mengarahkan studi ke suatu sasaran

penelitian dan bersifat mengkomparasikan antara metode riset kualitatif dan kuantitatif. Pondasi yang dibangun pada penelitian ini merupakan riset-riset yang telah terdahulu, studi kasus, literatur yang disebutkan serta data sekunder yang lainnya (Williams 2007). Penelitian ini menjadikan topik baru lebih dikenal oleh masyarakat luas, memberikan gambaran dasar mengenai topik bahasan, 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 tahap yaitu penelitian pendahuluan dan penelitian utama. Penelitian pendahuluan dilakukan dalam beberapa tahap yaitu untuk mengetahui waktu pemanenan khamir laut yang dipanen pada saat pertumbuhan atau untuk mengetahui fase logaritmik khamir laut. Penelitian pendahuluan juga dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui volume khamir laut yang optimal sebagai biokatalisator pada hidrolisat protein kerang darah berdasarkan derajat hidrolisis yang dihasilkan, sehingga dari volume khamir laut yang terbaik digunakan untuk acuan pada penelitian utama. Penelitian utama dilakukan untuk mengetahui waktu, suhu, pH, dan volume substrat yang optimal untuk membuat hidrolisat protein kerang darah dengan biokatalisator khamir laut serta untuk mengetahui profil asam amino dari hidrolisat protein yang dihasilkan.

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Penelitian Pendahuluan

a. Prosedur Penentuan Fase Log Khamir Laut

Prosedur penentuan fase log dilakukan dengan pengamatan melalui turbidimetri dan mikroskop. Pengamatan dilakukan dengan mengamati setiap 24 jam

sekali kultur khamir laut untuk diukur tingkat kekeruhan dengan menggunakan turbidimetri serta dilihat kepadatan sel khamir laut melalui mikroskop. Kultur khamir laut diamati mulai dari hari ke-0 sampai hari ke-9.

Prosedur pertama yang dilakukan dalam penentuan fase logaritmik yaitu mengkultur khamir laut. Menurut Made *et al.* (1996) prinsip kultur adalah perbanyak khamir laut yang dapat memproduksi protease, pada proses pertumbuhannya menggunakan media air laut dengan memanfaatkan gula sebagai sumber nutrisi, pupuk sebagai sumber nitrogen dan aerasi yang cukup sebagai suplai oksigen dalam pertumbuhannya. Khamir mampu mentransportasikan dan memanfaatkan senyawa nitrogen organik dan anorganik. Selama pertumbuhannya khamir laut menghasilkan senyawa-senyawa seperti nukleotida, asam amino, enzim dan faktor pertumbuhan yang belum diidentifikasi yang mampu menstimulasi pertumbuhan dan enzim. Menurut Bekatorou *et al.* (2006) dalam perkembangbiakan khamir, suplai udara adalah kebutuhan untuk produksi biomassa yang optimal.

Tahapan dalam mengkultur khamir laut jenis campuran yaitu sebagai berikut:

- Bahan berupa air laut, pupuk, dan biakan khamir laut disiapkan
- Air laut disterilkan dengan pemanasan sampai mendidih (± 1 jam) kemudian didinginkan pada suhu kamar
- Air laut steril yang sudah dingin dimasukkan ke dalam botol gelas kemudian ditambahkan gula pasir 0,5% sebagai sumber nutrisi dan pupuk daun 0,2% sebagai sumber nitrogen (v:b) lalu dihomogenkan sehingga diperoleh media khamir laut.
- Media khamir laut ditambah starter khamir laut sebanyak 0,2% dari air laut yang digunakan (v:v) lalu dihomogenkan.

- Botol yang digunakan ditutup kapas dan plastik *warp* untuk menghindari kontaminasi yang tidak diinginkan selanjutnya kultur tersebut diberi aerasi.
- Aerasi dilakukan selama sembilan hari untuk dilakukan pengamatan tingkat kekeruhan dan kepadatan sel khamir laut.

Prosedur pengamatan tingkat kekeruhan pada kultur khamir laut yaitu pada hari pertama sampai hari ke-sembialan kultur khamir laut yang telah diaereasi diambil sebanyak 1 mL untuk dilakukan pengenceran dari 10^{-1} sampai 10^{-4} . Adapun prosedur kerja yang dilakukan adalah sebagai berikut :

- Media khamir laut sebanyak 9 mL disiapkan sebagai blanko ketika pengujian menggunakan turbidimetri.
- Media khamir laut sebanyak 9 mL dibuat pada masing-masing empat tabung reaksi untuk diberi perlakuan tingkat pengenceran 10^{-1} sampai 10^{-4} , kemudian untuk tabung reaksi 10^{-1} yang telah berisi media diberi kultur khamir laut sebanyak 1 mL yang telah diaereasi, selanjutnya dihomogenkan dengan menggunakan *vortex mixer*.
- Dari tabung reaksi 10^{-1} yang telah dihomogenkan diambil 1 mL untuk dimasukkan ke dalam tabung reaksi 10^{-2} kemudian dari tabung reaksi tersebut dihomogenkan begitu seterusnya sampai 10^{-4} .
- Masing-masing hasil pengenceran dari 10^{-1} sampai 10^{-4} diuji kekeruhannya dengan menggunakan turbidimetri.

Pengamatan morfologi khamir laut dilakukan setiap hari dengan menggunakan mikroskop yaitu dengan mengambil kultur khamir laut yang diaereasi dengan menggunakan pipet tetes lalu ditetaskan di *objek glass* dan ditutup dengan *cover glass* selanjutnya diamati di bawah mikroskop.

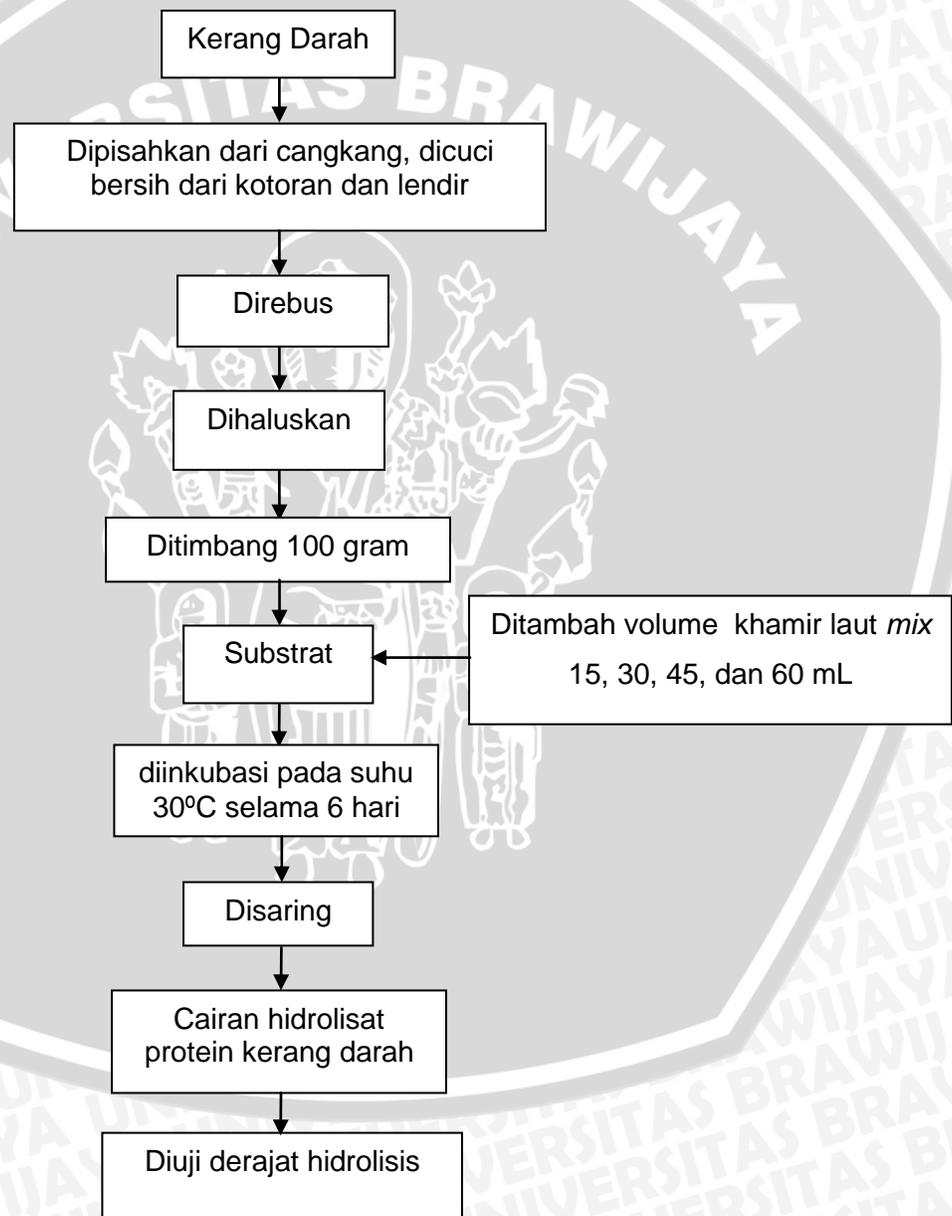
c. Prosedur Penentuan Volume Optimal Khamir Laut dan Penggunaan Bentuk Substrat Terbaik

Penentuan volume khamir laut yang optimal untuk ditambahkan pada proses pembuatan hidrolisat protein kerang darah, prosedur kerja pertama yang dilakukan yaitu membuat substrat dari kerang darah. Penggunaan berat daging kerang darah yang digunakan pada penelitian pendahuluan ini mengacu pada penelitian terdahulu Faharudin (2002) pada ikan peperek yaitu dengan menggunakan substrat berupa daging peperek yang halus sebanyak 100 gram dengan volume optimal khamir laut yang ditambahkan yaitu 30 mL (b:v). Pada penelitian ini sumber protein yang digunakan berbeda yaitu menggunakan kerang darah sehingga dilakukan dua percobaan untuk menentukan penggunaan substrat yang terbaik yaitu dengan menggunakan langsung daging kerang darah yang dihaluskan sebagai substrat dan percobaan kedua yaitu menggunakan supernatan dari daging kerang darah sebagai substrat. Pada kedua percobaan tersebut volume khamir laut yang ditambahkan ada empat perlakuan yaitu 15 mL, 30 mL, 45 mL, dan 60 mL.

Prosedur pembuatan hidrolisat protein kerang darah dengan substrat dari kerang darah yang dihaluskan pada percobaan pertama adalah :

- Kerang darah dipisahkan dari cangkangnya, dicuci dari kotoran dan lendir kemudian direbus.
- Daging kerang yang telah direbus dihaluskan dan ditimbang sebanyak 100 gram untuk masing-masing perlakuan.
- Daging kerang yang telah halus merupakan substrat yang siap digunakan lalu ditambah dengan khamir laut sesuai dengan perlakuan 15 mL, 30 mL, 45 mL, dan 60 mL kemudian ditutup dengan plastik *warp* dan diinkubasi selama 6 hari pada suhu 30°C. Hasil hidrolisis diuji Derajat Hidrolisis (DH) dari setiap perlakuan.

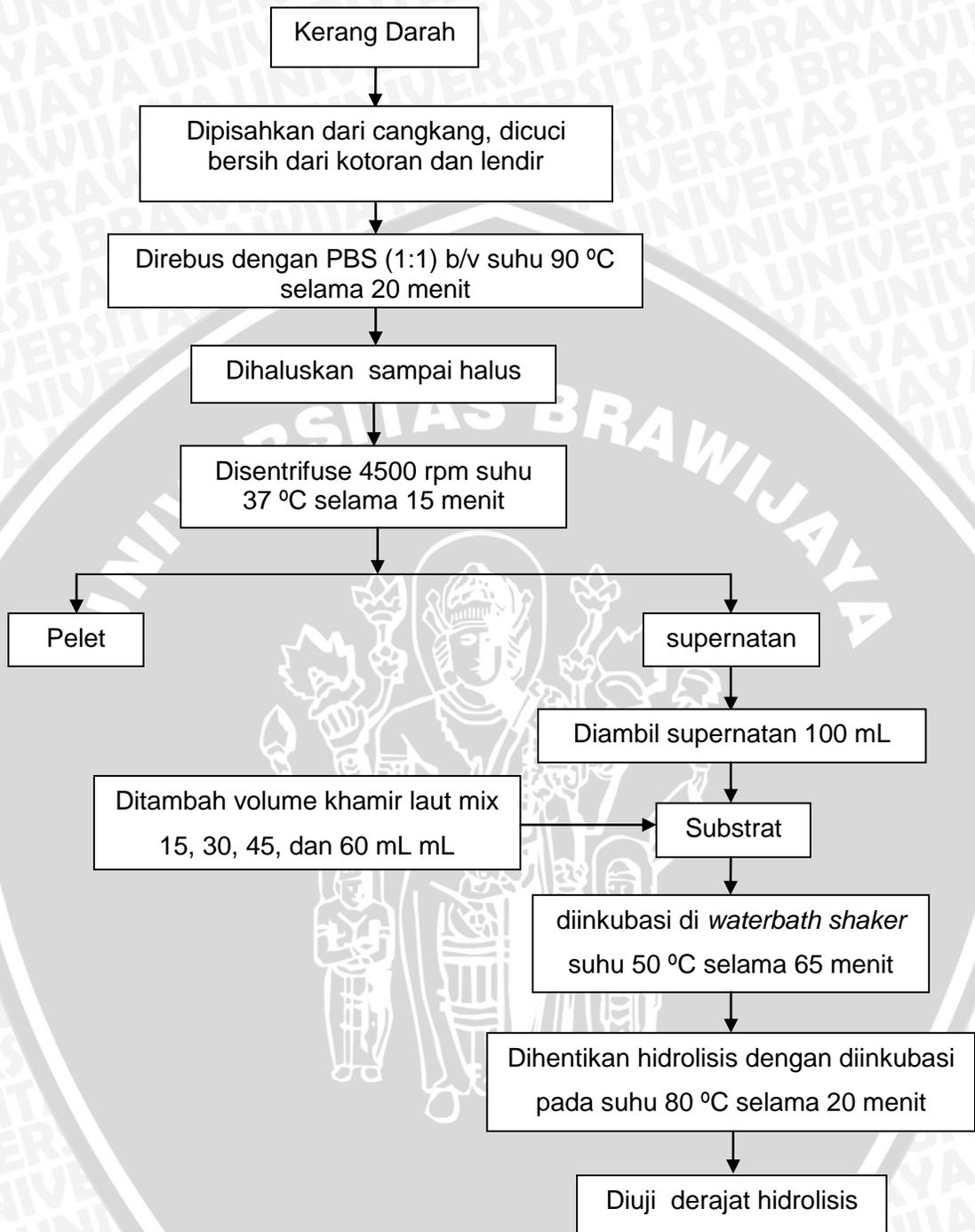
Pemilihan waktu inkubasi dan suhu pada penelitian pendahuluan percobaan pertama ini mengacu pada waktu dan suhu optimal pada penelitian Faharudin (2002) dengan menggunakan khamir laut jenis *mix* untuk menghidrolisis protein ikan peperek. Skema kerja pembuatan substrat pada percobaan pertama dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Skema Kerja Pembuatan Hidrolisat Protein Percobaan I

Prosedur pembuatan hidrolisat protein kerang darah dengan substrat dari supernatan kerang darah pada percobaan kedua adalah :

- Kerang darah dipisahkan dari cangkangnya, dicuci dari kotoran dan lendir.
- Daging kerang darah yang sudah bersih direbus dengan menggunakan larutan PBS perbandingan 1:1 (b:v) pada suhu 90°C selama 20 menit.
- Daging kerang darah yang telah direbus kemudian diblender sampai halus dan selanjutnya disentrifuse dengan kecepatan 4500 rpm selama 15 menit dengan suhu 37°C. setelah disentrifuse akan didapatkan pelet dan supernatan.
- Supernatan yang didapatkan merupakan substrat yang kemudian diberi perlakuan dengan penambahan volume khamir laut yang berbeda-beda yaitu 15 mL, 30 mL, 45 mL, dan 60 mL.
- Substrat yang telah ditambah khamir laut diinkubasi di *waterbath shaker* pada suhu 50°C selama 65 menit. Pemilihan waktu dan suhu pada penelitian pendahuluan percobaan kedua ini mengacu pada waktu dan suhu optimal penelitian Syafii (2011) yang menggunakan supernatan dari ikan peperek sebagai substrat dan dialisat ekstraselular khamir laut sebagai sumber protease.
- Setelah 65 menit, hidrolisis dihentikan dengan diinkubasi di *waterbath* pada suhu 80 °C selama 20 menit kemudian diuji DH. Skema kerja pembuatan substrat pada percobaan kedua dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Skema Kerja Pembuatan Hidroisat Protein Percobaan II

3.3.2 Penelitian Utama

Penelitian utama ini meliputi penentuan suhu, waktu, dan pH optimal. Optimasi ini berdasarkan derajat hidrolisis protein yang dihasilkan. Hasil dari penggunaan hasil optimasi tersebut terhadap hidrolisat protein yang dihasilkan kemudian dianalisa profil asam aminonya dengan menggunakan HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*)

Langkah-langkah yang dilakukan pada penelitian utama ini adalah pembuatan hidrolisat protein kerang darah berdasarkan prosedur kerja pada penelitian pendahuluan dari hasil yang terbaik. Penentuan waktu inkubasi optimal dilakukan dengan penghentian hidrolisis pada jenjang waktu 40, 80, 120, dan 160 menit. Hasil hidrolisis dari penggunaan waktu tersebut kemudian diuji derajat hidrolisis. Penggunaan waktu inkubasi dengan hasil DH tertinggi kemudian dijadikan acuan untuk membuat hidrolisat protein kerang darah dalam menentukan suhu optimal yaitu dengan menggunakan waktu inkubasi optimal dan hidrolisis dihentikan pada suhu 30, 40, dan 50 °C. Penggunaan suhu dengan hasil DH tertinggi kemudian dijadikan acuan sebagai penentuan pH yaitu dengan mengatur pH sebesar 10, 11, 12 dan 13.

Prosedur uji DH yaitu dengan melakukan analisa N total dan N terlarut, adapun prosedur kerja yang dilakukan yaitu sebagai berikut :

- Hidrolisat protein kerang darah sebanyak 1 mL (untuk analisa total), hidrolisat protein kerang darah ditambahkan TCA 20 % sebanyak 20 mL kemudian disentrifuse 5000 rpm, suhu 4 °C selama 10 menit. Supernatan yang didapat dianalisa N terlarut.

- Hidrolisat protein kerang darah sebanyak 1 mL dimasukkan dalam labu Kjeldahl kemudian ditambahkan 1 gr tablet Kjeldahl, 10 mL H₂SO₄ dan 2 butir batu didih kemudian dihomogenkan.
- Hidrolisat protein kerang darah kemudian dipanaskan pada alat destruksi (±1 jam) sampai warna hijau jernih, kemudian didinginkan dalam air, disaring dan dihomogenkan dengan cara dikocok.
- 5 mL larutan hidrolisat protein kerang darah kemudian diambil, dimasukkan tabung reaksi, lalu ditambahkan 0,5 mL larutan KNa tartrat, 0,5 mL larutan Nesler, dan 5 mL aquades.
- Larutan hidrolisat tersebut kemudian dihomogenkan dan didiamkan selama 10 menit kemudian dibaca absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 490 nm.

Hasil N total dan N terlarut yang didapat kemudian dihitung DH dengan rumus sebagai berikut :

$$DH = \frac{\text{Nitrogen terlarut dalam sampel}}{\text{Total N dalam sampel}} \times 100$$

Hasil perhitungan dari DH kemudian dibuat kurva polynomial yang menyatakan hubungan antara DH sebagai sumbu Y sedangkan waktu, suhu dan pH sebagai sumbu X.

Analisa HPLC adalah pada prinsipnya digunakan untuk derivatisasi asam-asam amino, menghasilkan derivat yang bersifat fluoresen, kemudian akan dipisahkan dengan prosedur kromatografi kolom fase dibalik (*reversed phase column chromatography*). Hasil yang diperoleh dideteksi dan diukur dengan suatu 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 untuk mendapatkan kromatogram. Kromatogram memuat waktu lambat serta tinggi puncak suatu senyawa.

Kolom : Licrospher 100 RP 18 (15 μ m)

Panjang kolom 125 ml x 4 mm

Fase gerak : A = CH₃OH : 50 mM natrium asetat : THF (2:96:2) pH 6.8

B = 65% CH₃OH

Kecepatan aliran : 45.0 Minutes

Detektor : Fluoresen Shimadzu RF – 138

EX Wavelength : 360 EM Wavelength : 460

Prosedur kerja HPLC yang dilakukan adalah sebagai berikut:

- Sampel hidrolisat protein kerang darah sebanyak 60 mL ditambah 4 mL HCL 6 N, kemudian dipanaskan pada suhu 110 C selama 24 jam, dinetralkan (pH 7) dengan NaOH 6 N dan disaring dengan kertas saring Whatman 0.2 μ m.
- Buffer Borat : dilarutkan 3,092 gr asam borat dalam 100 mL aquabides dan ditambahkan Na borat sampai pH 9,1 kemudian dilakukan penyaringan.
- Selanjutnya dicampurkan larutan OPA (o-phthaldehyde) dan ditambah 4 mL Buffer Borat dan 1 mL methanol dan 1-2 tetes merkaptoetanol (30 μ L).
- Setelah prosedur di atas selesai kemudian hasil dari masing-masing sampel diambil sebanyak 10 μ L kemudian ditambah larutan OPA (O-phthaldehyde) sebanyak 300 μ L diaduk selama 45 menit.
- Selanjutnya dimasukkan ke *injector* HPLC sebanyak 5 μ L.
- Didapatkan kromatogram, kemudian dianalisis.

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

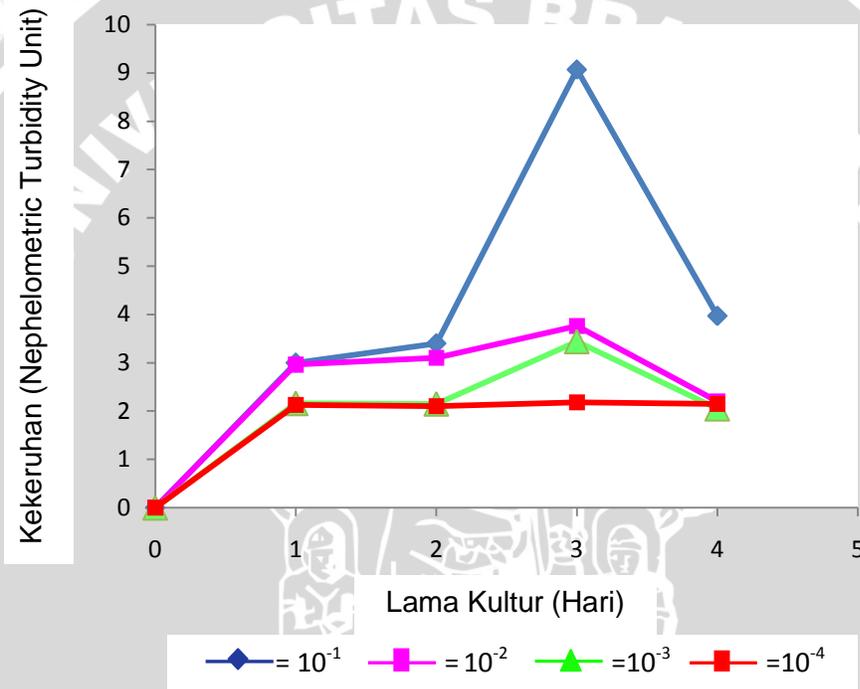
4.1 Penelitian Pendahuluan

4.1.1 Pertumbuhan Khamir Laut

Pertumbuhan khamir laut ini ditentukan berdasarkan tingkat kekeruhan.

Hasil dari pengamatan kekeruhan khamir laut didapatkan berdasarkan lama kultur.

Hasil pengamatan tingkat kekeruhan dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Kekeruhan Kultur Khamir Laut pada Berbagai Tingkat Pengenceran dan Lama Kultur

Gambar 4 memperlihatkan bahwa pada hari ke-0 belum terjadi pertumbuhan pada semua faktor pengenceran. Pada hari pertama dan kedua memperlihatkan mulai adanya nilai kekeruhan pada semua faktor pengenceran dengan hasil kekeruhannya tidak terlalu berbeda. Pada kedua hari tersebut kecuali pada faktor pengenceran 10^{-1} mulai menunjukkan nilai kekeruhan yang lebih tinggi dibandingkan

faktor pengenceran yang lain. Adanya nilai kekeruhan tersebut menunjukkan bahwa khamir laut mulai mengalami pertumbuhan.

Pada hari ketiga menunjukkan perbedaan yang sangat nyata dimana pada hari tersebut tingkat kekeruhannya tinggi khususnya pada pengenceran 10^{-1} . Hari keempat memperlihatkan bahwa grafik yang ditunjukkan turun kembali pada semua faktor pengenceran yang berarti bahwa tingkat kekeruhannya juga menurun sehingga pada hari keempat ini pertumbuhan khamir lautpun juga mengalami penurunan. Akibat tingkat pengenceran yang berbeda inilah menghasilkan grafik pertumbuhan yang berbeda dimana pada faktor pengenceran 10^{-1} menghasilkan nilai kekeruhan yang paling tinggi di semua hari.

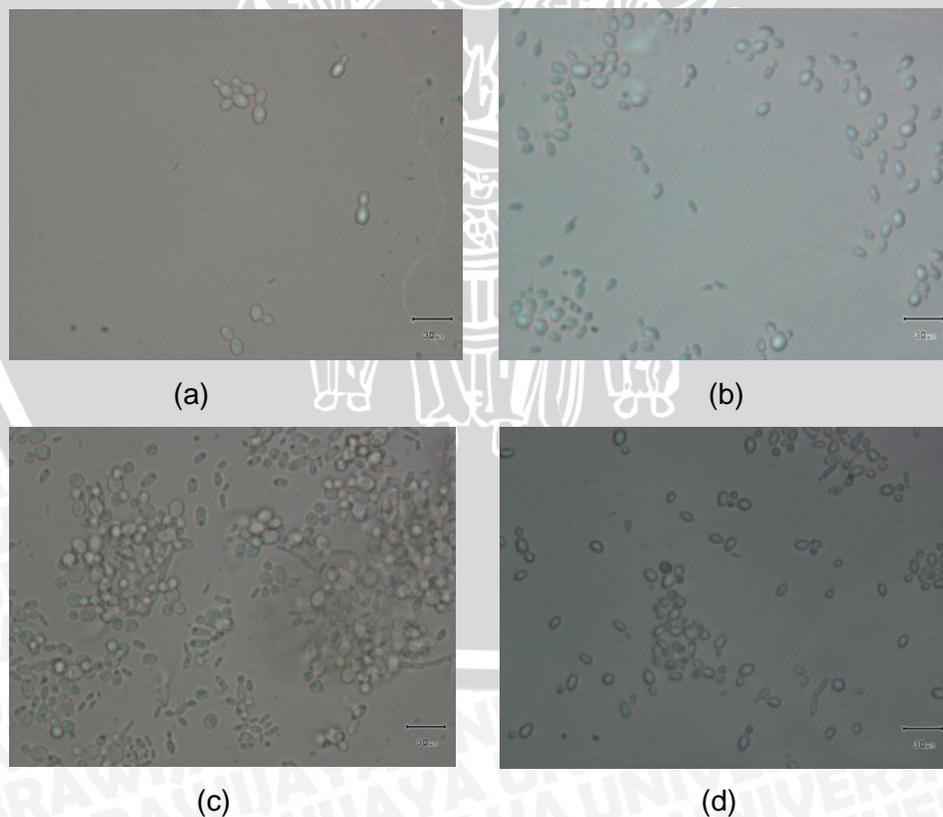
Tingkat pengenceran 10^{-1} dengan jumlah kultur khamir laut terbanyak memiliki kekeruhan paling tinggi walaupun kandungan dan jumlah nutrisinya sama dengan faktor pengenceran yang lainnya. Kekeruhan paling tinggi pada faktor pengenceran 10^{-1} dikarenakan jumlah kultur khamir laut yang ditambahkan efektif dalam menguraikan nutrisi yang ada atau jumlah kultur khamir laut pada faktor pengenceran 10^{-1} tidak mengalami kejenuhan atau kekurangan sel dan nutrisi. Faktor pengenceran 10^{-1} dengan jumlah kultur khamir laut yang tepat dalam menguraikan nutrisi inilah yang menyebabkan tingginya produksi jumlah sel-sel baru sehingga kekeruhan kultur khamir lautpun meningkat.

Perbedaan lama kultur terhadap tingkat kekeruhan yang dihasilkan merupakan penunjuk terjadinya fase-fase pertumbuhan khamir laut. Grafik yang ditunjukkan oleh Gambar 4 memperlihatkan bahwa khamir laut memiliki fase-fase pertumbuhan dimana fase pertumbuhan yang paling cepat yaitu pada hari ke-3 karena memiliki tingkat kekeruhan yang paling tinggi. Hasil tersebut menunjukkan

bahwa pada hari ke-3 khamir laut mengalami pembelahan secara cepat. Kondisi tersebut dikenal dengan istilah fase log.

Pada fase log di hari ke-3 memperlihatkan bahwa pada faktor pengenceran 10^{-1} memiliki kepadatan paling tinggi. Hal tersebut disebabkan pada fase log di hari ke-3 sel membelah dengan kecepatan yang tinggi sehingga dengan nutrisi yang sama di semua faktor pengenceran namun sel khamir yang lebih banyak akan cepat menghasilkan sel baru yang lebih banyak dibandingkan pada faktor pengenceran yang lebih tinggi.

Fase log yang terjadi pada hari ke-3 diperkuat dengan hasil pengamatan mikroskop dengan perbesaran 1000x. Mikrograf yang dihasilkan dari kepadatan khamir laut terhadap lama kultur dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Mikrograf Kepadatan Khamir Laut dalam Berbagai Lama Kultur Hari Pertama (a), Hari Kedua (b), Hari Ketiga (c), dan Hari keempat (d)

Gambar 5 memperlihatkan bahwa sel khamir laut berbentuk bulat dan beberapa dari sel tersebut terlihat telah mengalami pertunasan (*budding*). Banyaknya sel yang mengalami pertunasan menunjukkan bahwa sel khamir laut sedang mengalami pembelahan sel dan akan membentuk sel-sel baru. Pertunasan banyak terlihat di Gambar 5 (c) atau pada hari ke-3 karena pada hari tersebut menunjukkan pembelahan sel yang banyak atau yang disebut dengan fase log. Menurut Buckle (2004) terdapat berbagai macam bentuk khamir yang tergantung pada cara pembelahan selnya. Pembelahan sel terjadi secara aseksual dengan pembentukan tunas. Mula-mula timbul suatu gelembung kecil dari permukaan sel induk. Gelembung ini secara bertahap membesar, dan setelah mencapai ukuran yang sama dengan induknya terjadi pengerutan yang melepaskan tunas dari induknya. Sel yang baru terbentuk selanjutnya akan memasuki tahap pertunasan kembali.

Gambar 5 (d) memperlihatkan bahwa di hari ke-4 telah terjadi penurunan pembelahan sel khamir laut. Hal tersebut disebabkan di hari ke-4 telah mengalami penurunan kecepatan pertumbuhan diakibatkan ketersediaan nutrisi yang mulai berkurang dan faktor-faktor lain yang mengganggu biakan. Penurunan sel di hari ke-4 ini juga menunjukkan bahwa pada hari ke-3 merupakan fase log.

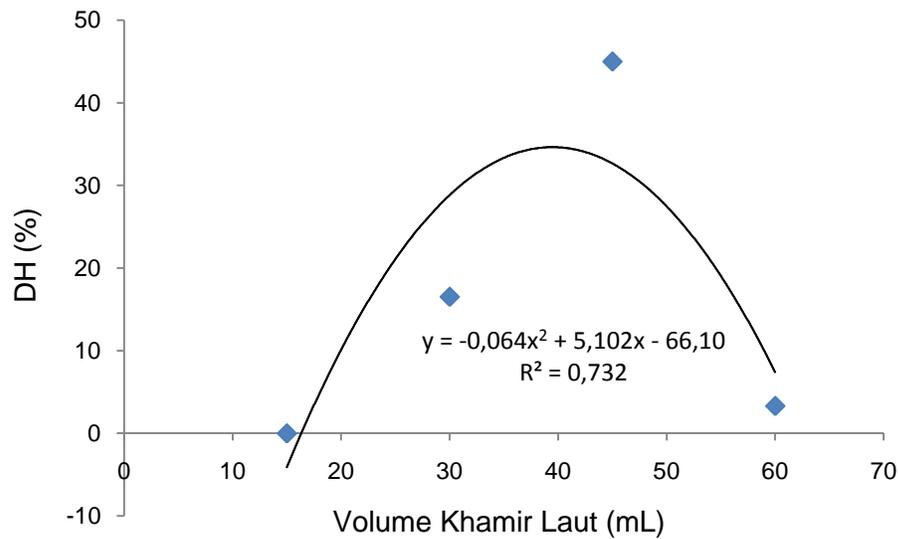
4.1.2 Bentuk Substrat Terbaik dan Volume Optimal Khamir Laut

Penentuan bentuk substrat ini bertujuan sebagai landasan dalam melakukan penelitian utama yang berdasarkan hasil terbaik dari dua percobaan. Percobaan pertama berdasarkan penelitian terdahulu Faharudin (2002) dengan menggunakan substrat dari daging ikan peperek yang dihaluskan dan percobaan kedua berdasarkan penelitian Imam (2011) dengan menggunakan supernatan dari daging

ikan peperek sebagai substratnya sehingga pada penelitian ini daging ikan diganti dengan daging kerang darah.

Hasil dari percobaan pertama mengalami pembusukan sebelum 24 jam inkubasi. Hal tersebut disebabkan khamir laut yang mengandung protease tidak mampu menguraikan protein kerang darah dengan substrat yang berbentuk padat. Pada percobaan kedua dengan substrat dari supernatan kerang darah menunjukkan hasil bahwa substratnya tidak mengalami pembusukan. Hal tersebut menunjukkan bahwa khamir laut yang mengandung protease lebih mudah menghidrolisis protein yang larut di dalam air. Menurut Naiola dan Widyastuti (2002) protease adalah enzim yang mengkatalisasi pemecahan ikatan peptida dalam peptida, polipeptida dan protein dengan menggunakan reaksi hidrolisis menjadi molekul-molekul yang lebih sederhana seperti peptida rantai pendek dan asam amino.

Penentuan volume khamir laut yang optimal digunakan sebagai landasan untuk melakukan penelitian utama dalam menambahkan khamir laut untuk menghidrolisis protein kerang darah. Volume khamir laut yang ditambahkan merupakan hasil dari kultur pada fase log. Hasil penentuan optimasi volume khamir laut terhadap persentase derajat hidrolisis ditunjukkan melalui kurva persamaan regresi seperti yang terlihat pada Gambar 6 dan perhitungan persamaan tersebut dapat dilihat pada Lampiran 1.



Gambar 6. Derajat Hidrolisis Protein Kerang Darah dalam Berbagai Volume Khamir Laut

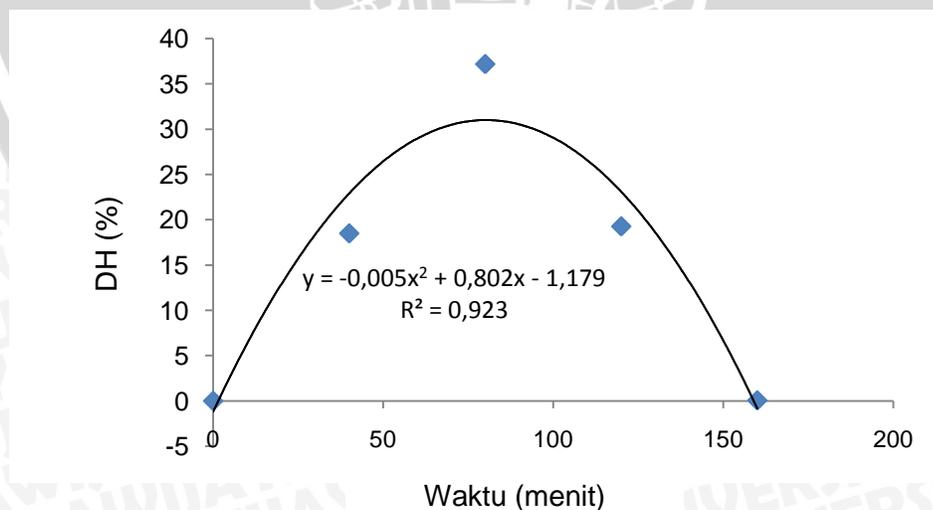
Gambar 6 memperlihatkan bahwa khamir laut memiliki volume optimal sebesar 40 mL dalam menghidrolisis protein kerang darah. Hasil penelitian Faharudin (2002) yang sama menggunakan khamir laut campuran dengan substrat ikan peperek menyatakan bahwa volume khamir laut yang optimal digunakan untuk menghidrolisis protein ikan peperek adalah 30 mL. Hal tersebut menunjukkan bahwa volume yang digunakan tidak jauh berbeda dari penelitian ini yaitu 40 mL. Adapun perbedaan yang tidak terlalu jauh ini diduga disebabkan sama-sama menggunakan khamir laut campuran namun kespesifikan khamir laut yang mengandung protease dalam menghidrolisis protein dari jenis dan bentuk substrat yang digunakan berbeda sehingga menyebabkan perbedaan jumlah volume yang digunakan untuk menghidrolisispun berbeda. Menurut Rao *et al.* (1998) protease atau enzim proteolitik adalah enzim yang memiliki daya katalitik yang spesifik dan efisien terhadap ikatan peptida dari suatu molekul polipeptida atau protein.

Pada volume khamir laut yang di atas volume optimal misalnya pada volume 60 mL menunjukkan bahwa aktivitas hidrolisis yang dihasilkan semakin menurun hal tersebut dikarenakan volume khamir laut memiliki batas maksimum yang apabila telah lewat dari batas maksimum maka dapat menjadikan khamir laut jenuh terhadap substrat sehingga tidak dapat menghidrolisis dengan baik. Menurut Lehninger (1993) pada proses hidrolisis substrat dengan enzim yang optimal maka kecepatan aktivitas katalik enzim semakin baik dan akhirnya akan mencapai suatu batas maksimum dan setelah batas ini terlampaui, kecepatan reaksi tetap meningkat tetapi dengan nilai yang semakin kecil. Pada kondisi tersebut enzim menjadi jenuh oleh substratnya dan tidak dapat berfungsi lebih cepat.

4.2 Penelitian Utama

4.2.1 Waktu Optimal Khamir Laut dalam menghidrolisis Protein Kerang Darah

Persentase derajat hidrolisis ditunjukkan melalui kurva persamaan regresi seperti yang terlihat pada Gambar 7 dan perhitungan persamaan tersebut dapat dilihat pada Lampiran 2.

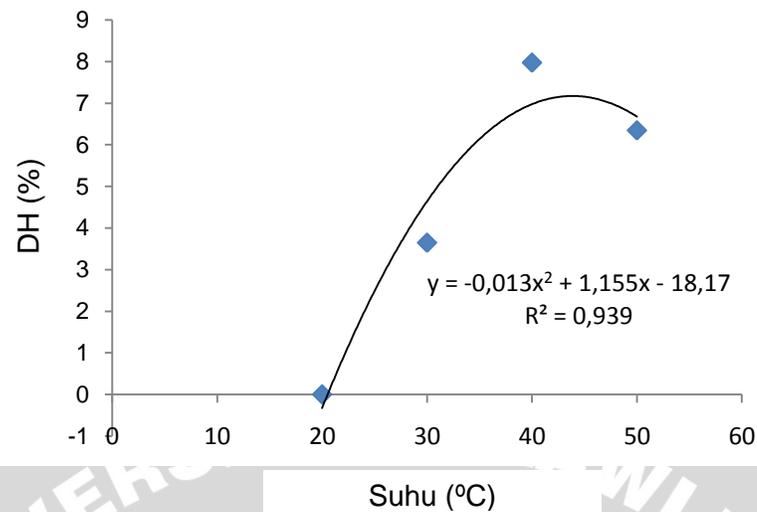


Gambar 7. Derajat Hidrolisis Protein Kerang Darah dalam Berbagai Waktu Hidrolisis

Gambar 7 memperlihatkan bahwa waktu optimal untuk menghidrolisis protein kerang darah pada menit ke-80 dengan derajat hidrolisat protein kerang darah sebesar 30,98%. Pada waktu inkubasi yang kurang atau lebih dari 80 menit menunjukkan kurva yang menurun. Hasil penelitian dari Faharudin (2002) waktu yang digunakan adalah 6 hari hal tersebut menunjukkan bahwa hasil optimasi waktu pada penelitian ini lebih cepat dibandingkan dengan penelitian sebelumnya. Perbedaan yang jauh dari waktu optimal yang dihasilkan pada penelitian ini disebabkan bentuk substrat yang digunakan berbeda. Pada penelitian Faharudin menggunakan substrat berbentuk padat yang menyebabkan khamir laut memiliki waktu yang lama dalam menghidrolisis dibandingkan dengan substrat yang berbentuk cair. Apabila dibandingkan dengan penelitian Khotim (2011) yang sama menggunakan substrat dalam bentuk supernatan maka waktu optimal yang digunakan tidak jauh berbeda yaitu sebesar 82 menit.

4.2.2 Suhu Optimal Khamir Laut dalam menghidrolisis Protein Kerang Darah

Hasil penentuan optimasi suhu yang digunakan khamir laut terhadap persentasi derajat hidrolisis ditunjukkan melalui kurva persamaan regresi seperti yang terlihat pada Gambar 8 dan perhitungan persamaan tersebut dapat dilihat pada Lampiran 3.



Gambar 8. Derajat Hidrolisis Protein Kerang Darah dalam Berbagai Suhu Hidrolisis

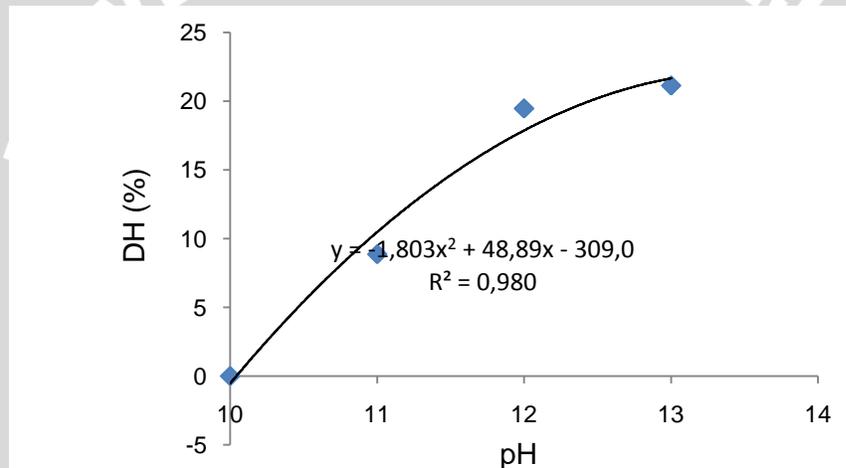
Suhu 44°C yang ditunjukkan pada Gambar 6 menjelaskan bahwa khamir laut menghidrolisis protein kerang darah secara efektif pada suhu 44°C. Suhu optimal hasil penelitian ini lebih tinggi dibandingkan dengan hasil penelitian Faharudin yaitu sebesar 30°C. Perbandingan hasil ini menunjukkan bahwa khamir laut membutuhkan suhu yang lebih tinggi untuk menghidrolisis substrat dalam bentuk cair. Hal tersebut juga didukung oleh penelitian Khotim (2011) yang menyatakan bahwa dengan substrat dalam bentuk cair membutuhkan suhu optimal sebesar 50°C, dimana suhu tersebut tidak jauh berbeda dengan hasil optimasi suhu pada penelitian ini yaitu sebesar 44°C.

Apabila suhu yang digunakan tidak optimal dalam artian kurang atau lebih dari suhu optimal maka aktifitas hidrolisispun akan menurun seperti yang terlihat pada kurva di Gambar 6. Pengaruh suhu pada reaksi enzimatik merupakan fenomena yang kompleks. Menurut Rahayu (2004) pada awalnya kenaikan suhu akan menyebabkan bertambahnya reaksi kecepatan enzim hingga tercapai suhu optimal, selanjutnya kecepatan reaksi akan menurun karena perubahan konformasi

pada substrat dan enzim. Pada suhu yang lebih tinggi akan terjadi denaturasi enzim sehingga enzim akan kehilangan aktivitas.

4.2.3 pH Optimal Khamir Laut dalam menghidrolisis Protein Kerang Darah

Hasil penentuan optimasi pH yang digunakan khamir laut terhadap persentase derajat hidrolisis ditunjukkan melalui kurva persamaan regresi seperti yang terlihat pada Gambar 9 dan perhitungan persamaan tersebut dapat dilihat pada Lampiran 4.



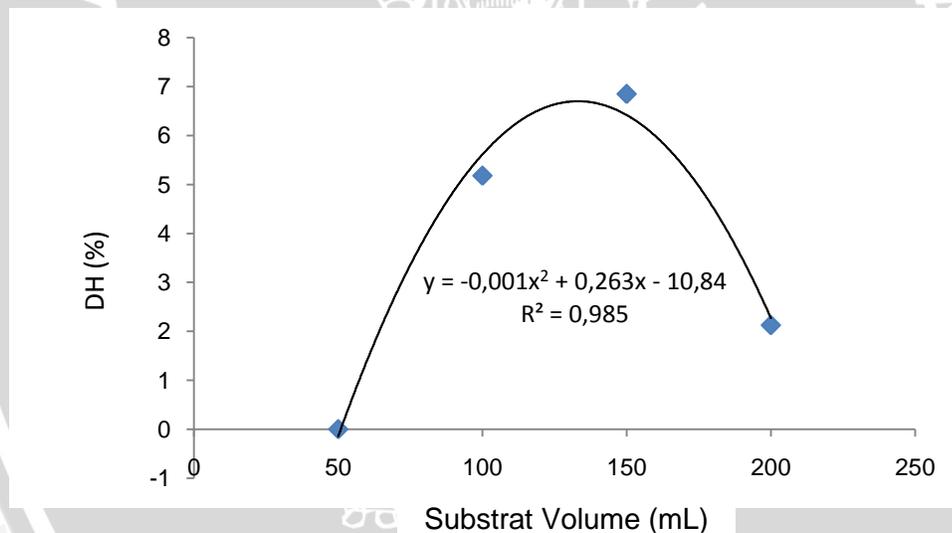
Gambar 9. Derajat Hidrolisis Protein Kerang Darah dalam Berbagai pH Hidrolisis

Gambar 9 menunjukkan bahwa pH 13 merupakan pH yang optimal dalam menghidrolisis protein kerang darah yaitu dengan presentasi derajat hidrolisis protein kerang darah sebesar 22%. pH 13 pada penelitian ini lebih tinggi dibandingkan dengan pH optimal yang dihasilkan oleh Khotim (2011) sebesar 9 sementara pada penelitian Faharudin (2002) tidak melakukan optimasi pH. Hal tersebut disebabkan pada pH 13 sisi aktif enzim protease yang ada dikeluarkan khamir laut dapat dengan efektif berikatan dengan protein yang ada di substrat kerang darah sehingga menyebabkan apabila pH yang digunakan kurang atau lebih

dari 13 akan mengurangi keefektifitasan protease dalam menghidrolisis protein kerang darah seperti yang terlihat pada kurva di Gambar 7. Menurut Rahayu (1990) pH akan mempengaruhi sisi aktif enzim dalam membentuk kompleks enzim substrat. pH yang sangat rendah atau tinggi dapat menyebabkan aktivitas enzim menurun.

4.2.4 Volume Substrat Optimal Kerang Darah

Hasil penentuan optimasi volume substrat kerang darah yang digunakan terhadap presentasi derajat hidrolisis ditunjukkan melalui kurva persamaan regresi seperti yang terlihat pada Gambar 10 dan perhitungan persamaan tersebut dapat dilihat pada Lampiran 5.



Gambar 10. Derajat Hidrolisis Protein Kerang Darah dalam Berbagai Volume Substrat

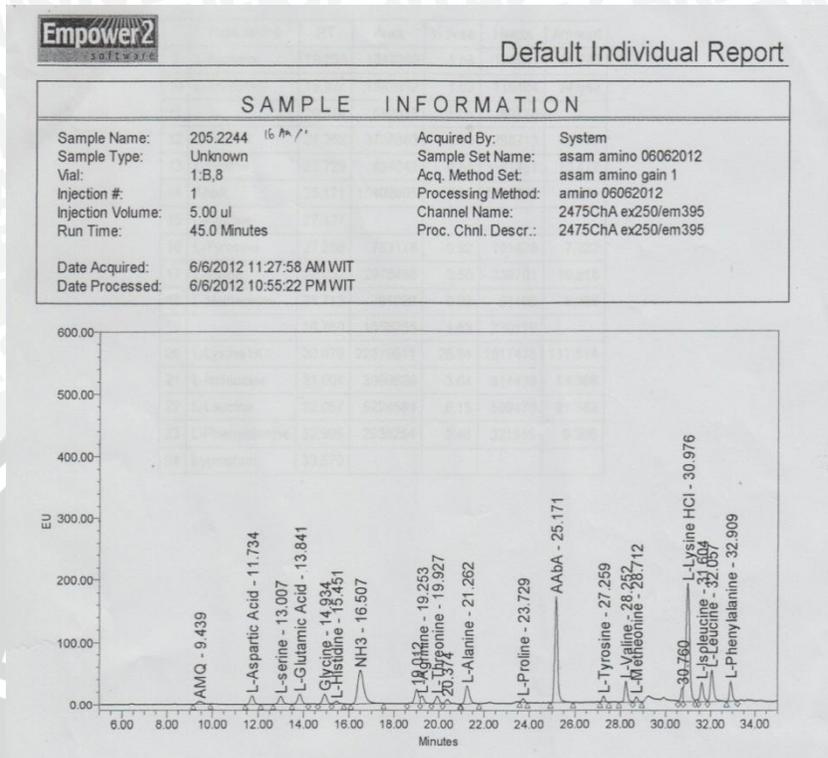
Gambar 10 dan pada Lampiran 5 menunjukkan bahwa dengan volume substrat 131 mL yang terbuat dari supernatan kerang darah merupakan substrat optimal yang digunakan oleh khamir laut dengan volume 40 mL (3:1); (v:v) untuk menghidrolisis protein kerang darah. Presentasi derajat hidrolisis protein kerang darah yang dihasilkan yaitu sebesar 6,452%. Pada penelitian-penelitian sebelumnya

selalu digunakan jumlah substrat sebesar 100 g atau 100 mL tanpa dilakukan optimasi sehingga keoptimalan hidrolisat protein yang dihasilkan kurang, selain itu juga tidak diketahui DH terakhir yang diperoleh setelah menggunakan semua parameter waktu, pH, suhu, enzim, dan substrat yang optimal.

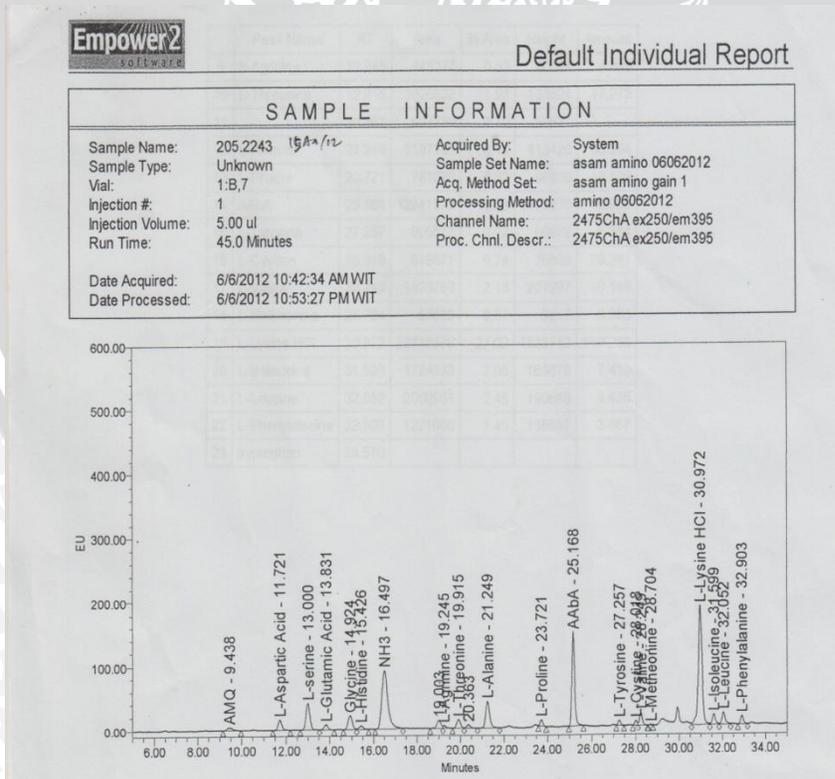
Pada volume substrat yang optimal yaitu sebesar 131 mL telah terjadi formasi enzim dan substrat yang sangat kuat karena sudah didukung dengan penambahan volume khamir laut yang sudah optimal yaitu sebesar 40 mL sehingga substrat dengan jumlah yang tepat akan diikat secara kuat oleh sisi aktif enzim yang ada di khamir laut. Oleh karena itu apabila substrat yang digunakan terlalu banyak atau sebaliknya maka dapat menjadikan aktivitas khamir laut dalam menghidrolisis substrat akan menurun seperti terlihat pada Gambar 8. Reaksi pembentukan produk dari substrat menggunakan energi aktivasi yang tinggi pada saat terjadi kondisi transisi proses perubahan substrat menjadi produk. Enzim mampu mempercepat reaksi dengan cara menurunkan energi aktivasi melalui pembentukan kompleks enzim-substrat (Wilson dan Walker 2000). Berdasarkan mekanisme pengikatan enzim terhadap substrat, proses hidrolisis tersusun atas dua tahap reaksi. Reaksi pertama adalah reaksi asilasi untuk membentuk ikatan kompleks enzim substrat, sedangkan reaksi kedua adalah reaksi deasilasi yang ditandai dengan hidrolisis ikatan kompleks enzim substrat menjadi produk dan enzim (Wong 1989).

4.2.5 Profil Asam Amino

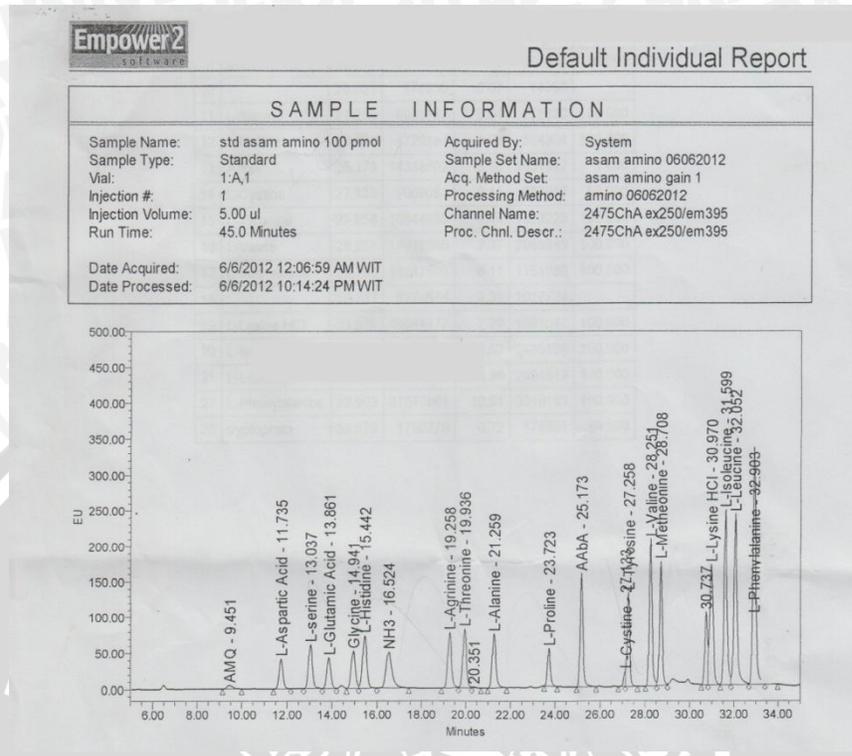
Profil asam amino sampel kerang darah dan hidrolisat proteinnya ditunjukkan oleh Gambar 11 dan 12 sedangkan standar asam aminonya dapat dilihat pada Gambar 13. Perhitungan kadar masing-masing asam amino didasarkan pada luas area tiap *peak*. Perhitungan dapat dilihat pada Lampiran 6 dan 7.



Gambar 11. Kromatogram Profil Asam Amino Kerang Darah



Gambar 12. Kromatogram Profil Asam Amino Hidrolisat Protein Kerang Darah



Gambar 13. Standart Kromatogram Profil Asam Amino

Standar jenis asam amino yang digunakan sebanyak 18 yaitu aspartat, serin, glutamat, glisin, histidin, arginin, threonin, alanin, prolin, sistin, tirosin, valin, metionin, lisin, isoleusin, leusin, fenilalanin dan triptofan. Hasil dari analisa menunjukkan bahwa ada 16 jenis asam amino yang terdapat pada kerang darah. Hal tersebut menunjukkan bahwa sampel dari kerang darah menghasilkan hampir semua jenis asam amino kecuali sistin dan triptofan.

Tidak adanya sistin dan triptofan pada kerang darah dari hasil penelitian ini sama dengan hasil penelitian Hidayat (2011) yang meneliti profil asam amino kerang bulu (*Anadara antiquata*) dimana kerang tersebut satu genus dengan kerang darah (*Anadara granosa*). Hasil penelitian tersebut menyatakan bahwa tiga asam amino triptofan, sistein, dan prolin terjadi kerusakan pada saat prosedur kerja sehingga

hanya 15 jenis asam amino yang teridentifikasi. Adapun perbandingan kandungan asam amino yang dihasilkan oleh kerang darah dan kerang bulu sebelum dihidrolisis dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Perbandingan kadar asam amino kerang darah dan kerang bulu segar

NO	Jenis Asam Amino	Kandungan Asam Amino (%)	
		Kerang darah	Kerang bulu ¹
Esensial			
1	Arginin	0.51	0.83
2	Histidin	0.18	0.15
3	Lisin	3.43	0.46
4	Threonin	0.34	0.42
5	Isoleusin	0.35	0.33
6	Leusin	0.56	0.76
7	Methionin	0.16	0.27
8	Fenilalanin	0.31	0.36
9	Triptofan	-	-
10	Valin	0.39	0.36
Non Esensial			
11	Aspartat	0.87	1.13
12	Sistin	-	-
13	Glutamat	1.10	1.74
14	Glisin	0.47	0.59
15	Serin	0.43	0.52
16	Alanin	0.74	0.84
17	Prolin	0.24	-
18	Tirosin	0.26	0.38
Total		10.34	9.14

Keterangan : ¹Hidayat (2011).

Adanya dua perbedaan yang signifikan pada asam amino prolin dan lisin tersebut menjadikan jumlah total asam amino kerang darah lebih besar dibandingkan dengan kerang bulu. Kelebihan-kelebihan tersebut menjadikan kerang darah lebih unggul dibandingkan dengan kerang bulu sebagai bahan baku produk hidrolisat protein sehingga hidrolisat protein kerang darah yang dihasilkan adalah hidrolisat yang memiliki jumlah kandungan asam amino tinggi serta merupakan produk yang dapat menyediakan asam amino esensial lisin yang tinggi.

Tabel 1 menunjukkan bahwa kandungan pada masing-masing jenis asam amino kerang darah dan kerang bulu tidak jauh berbeda namun ada jenis asam amino yang dimiliki oleh kerang darah tetapi tidak dimiliki oleh kerang bulu yaitu prolin. Disebutkan dari penelitian Hidayat (2011) bahwa tidak adanya asam amino prolin disebabkan telah terjadi kerusakan saat prosedur kerja. Kandungan asam amino lain yang sangat berbeda yaitu lisin. Kerang darah memiliki kandungan lisin yang tinggi dan jauh berbeda kandungannya dengan kerang bulu. Menurut Edison (2009), lisin merupakan asam amino esensial yang berfungsi sebagai antibodi darah, memperkuat sirkulasi, mempertahankan pertumbuhan sel-sel normal bersama prolin dan vitamin C yang akan membentuk jaringan kolagen, serta menurunkan kadar trigliserida darah yang berlebih.

Jenis asam amino berdasarkan tingkat kelarutannya dibagi menjadi dua yaitu hidrofilik dan hidrofobik. Pada Tabel 2 menunjukkan bahwa pada hidrolisat protein kerang darah dengan jenis asam amino yang hidrofilik cenderung mengalami kenaikan sedangkan pada asam amino jenis hidrofobik menunjukkan kecenderungan penurunan. Hasil tersebut memperlihatkan bahwa khamir laut mengandung protease spesifik dalam menghidrolisis substrat yang mengandung asam amino jenis hidrofilik. Jenis kadar asam amino hidrofilik yang tinggi disebabkan protease yang bekerja menggunakan reaksi hidrolase yang memecah ikatan peptida pada protein di dalam substrat supernatan kerang darah yang berbentuk cair sehingga protein yang tergolong hidrofilik ini dengan mudah mengalami peningkatan kadar asam aminonya. Menurut Ward (1983) protease merupakan suatu enzim yang sangat kompleks, mempunyai sifat fisiko-kimia dan sifat-sifat katalik bervariasi yang berperan sebagai katalis dalam pemecahan protein. Enzim ini digolongkan dalam jenis hidrolase karena dalam melakukan aktivitasnya membutuhkan air.

Tabel 2. Kandungan Pofil Asam Amino Kerang Darah dan Hidrolisat Proteinnya

NO	Asam Amino	μg Asam Amino g Kerang Darah	μg Asam Amino g Hidrolisat Protein Kerang Darah
Hidrofilik			
1	Arginin	0.513765	0.170333
2	Aspartat	0.875566	1.049708
3	Sistin	-	1.989489
4	Glutamat	1.101467	0.566529
5	Glisin	0.473696	0.640386
6	Histidin	0.184015	0.231804
7	Lisin	3.43588	3.487583
8	Serin	0.434437	1.417437
9	Threonin	0.349777	0.411495
Hidrofobik			
11	Alanin	0.748517	1.040458
12	Isoleusin	0.349117	0.194403
13	Leusin	0.560942	0.221277
14	Metionin	0.158103	0.011506
15	Fenilalanin	0.307412	0.127752
16	Prolin	0.241138	0.380594
17	Triptofan	-	-
18	Tirosin	0.261704	0.207067
19	Valin	0.387008	0.237782
Total		10.382544	12.623385

Tabel 2 menunjukkan bahwa produk hidrolisat protein kerang darah memiliki 18 macam asam amino sedangkan jika sebelum dihidrolisis hanya 17 macam asam amino. Menurut Kirk dan Othmer (1993) menyatakan bahwa hidrolisis yang berjalan sempurna akan menghasilkan hidrolisat yang terdiri dari campuran 18-20 macam asam amino. Hal ini berarti proses hidrolisis yang dilakukan sempurna selain itu juga didukung dengan data yang menunjukkan bahwa kadar total asam amino hidrolisat protein kerang darah mengalami peningkatan. Hasil ini menunjukkan bahwa efektifitas khamir laut *mix* yang dipanen pada fase log yaitu hari ke-3 mempengaruhi peningkatan kadar asam amino kerang darah.

Sembilan jenis asam amino telah mengalami peningkatan, diantaranya aspartat, sistin, glisin, histidin, lisin, serin, threonin, alanin, dan prolin. Peningkatan asam amino tersebut menjadikan total keseluruhan kadar asam amino hidrolisat protein kerang darah meningkat. Hal tersebut diduga bahwa protease yang terkandung dalam khamir laut bekerja lebih spesifik dalam memecah ikatan peptida protein kerang darah yang cenderung seperti alkalin protease karena memiliki pH optimum basa yaitu 13. Menurut Rao *et al.* (1998) alkalin protease merupakan golongan protease endopeptidase yang memecah ikatan peptida protein secara acak dan termasuk dari golongan protease serin yang aktif pada pH sekitar 9.

Tidak adanya sistin pada kerang darah memungkinkan pada saat menjadi produk hidrolisat protein juga tidak terdapat sistin, namun dari hasil analisa profil asam amino hidrolisat protein kerang darah menunjukkan adanya kandungan sistin. Kandungan sistin yang dihasilkan cukup tinggi kadarnya jika dilihat dari sebelumnya yang tidak ada, seperti yang ditunjukkan pada Tabel 2. Menurut Maks (1996), sistin terbentuk karena dua molekul sistein yang mengalami oksidasi, dimana sistin terdiri dari dua molekul sistein yang disatukan oleh sebuah ikatan disulfida. Menurut Fonselius (1996), senyawa hydrogen sulfida terbentuk karena adanya aktifitas mikroorganisme untuk menguraikan zat organik dalam kondisi anaerobik. Penambahan khamir laut tanpa diekstrak atau yang masih tercampur dengan medianya yang mengandung senyawa-senyawa organik ketika dimasukkan dalam substrat pada suasana anaerobik maka khamir laut dapat menguraikan komponen-komponen organik yang ada di dalam campuran substrat tersebut menjadi hidrogen sulfida. Hidrogen sulfida yang terbentuk dapat memicu sistein yang ada di dalam kerang darah untuk berinteraksi sehingga menyebabkan terbentuknya ikatan disulfida dan membentuk sistin.

5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah khamir laut yang dipanen pada fase log mempengaruhi hidrolisis protein kerang darah. Khamir laut mengalami fase log pada hari ke-3. Khamir laut yang dipanen pada fase log mampu menghidrolisis protein kerang darah dengan ketentuan volume khamir laut dan substrat dari kerang darah dalam bentuk supernatan (1:3); (v:v) dengan inkubasi 80 menit, suhu 44 °C dan pH 13.

Hasil analisa profil asam amino yang dihasilkan oleh hidrolisat protein kerang darah lebih tinggi kadarnya serta jenisnya dibandingkan dengan kerang darah tanpa dihidrolisis oleh khamir laut. Ada 16 asam amino yang dikandung oleh kerang darah tanpa dihidrolisis khamir laut dengan total kadar asam amino sebanyak 10.382544 µg/g dan 17 jenis asam amino yang dihasilkan oleh hidrolisat protein kerang darah dengan total kadar asam amino sebanyak 12.623385 µg/g. Protease yang terkandung dalam khamir laut untuk menghidrolisis protein kerang darah adalah alkalin protease dari golongan serin yang termasuk endopeptidase dengan menggunakan reaksi hidrolase.

5.2 Saran

Perlu adanya penelitian lebih lanjut mengenai hidrolisat protein kerang darah menggunakan protease ekstraseluler khamir laut.

DAFTAR PUSTAKA

- Adams, M.R., and M.O. Moss. 2000. Food Microbiology Second Edition. The Royal Society of Chemistry. Cmbridge. UK.
- Adams, M.R., and M.J.R., Nout. 2001. Fermentation and Food Safety. Alpen Publishers., Inc. Maryland. USA.
- Akhdiya, A. 2003. Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Protease Alkalin Termotabil. *Buletin Plasma Nutfah*. **9** (2): 38-44.
- Balqis, U. 2007. Purifikasi dan Karakterisasi Protease dari Ekskretori/Sekretori Stadium L3 *Ascaridia galli* dan Pengaruhnya terhadap Pertahanan dan Gambaran Histopatologi Usus Halus Ayam Petelur. IPB. Bogor.
- Budyanto D, I Ismanadji, US Aji dan Sugiri. 1990. Laporan Uji Coba Depurasi Kerang-kerangandan Kaitannya dengan Pengalengan. BBPMHP. Jakarta.
- Bauer, M.W., Halio, S.B., and R.M. Kelly. 1996. Proteases and Glycosyl Hydrolases from Hyperthermophilic Microorganisms. *Adv Protein Chem.* (48): 271-310.
- Buckle, K. A., R. A. Edward, G. H. Fleet dan M. Wooton. 1987. Ilmu Pangan. Alih Bahasa Hari Purnomo dan Adiono. UI Press. Jakarta. 326 hlm.
- Desrosier, N.W. 1988. Teknologi Pengawetan Pangan Edisi Ketiga. Penerjemah: M. Muljohardjo. Universitas Indonesia Press. Jakarta.
- Djamali, A. 1998. *Potensi dan Penyebaran sumber Daya Ikan Laut di Perairan Indonesia*. Fakultas Perikanan IPB. Institut Pertanian Bogor.
- Donaghy, J.A., A.M., 1993. Production and properties of alkaline protease by *Aureobasidium pullulan*. *J. Appl. Bacteriol.* (74): 662-666.
- Edison T. 2009. Amino acid: Esensial for our bodies. <http://livewellnaturally.com>. Diakses tanggal 30 Maret 2011.
- Faharudin. 2002. Studi Penggunaan Marine Yeast jenis Mix pada Proses Pembuatan Hidrolisat Protein dari Ikan Peperek (*Leiognathus sp.*). Skripsi. Fakultas Perikanan. Universitas Brawijaya. Malang.
- Fardiaz, S,. 1992. Mikrobiologi Pangan 1. Penerbit PT Gramedia Utama. Jakarta. Hal 43-56.
- Febriani, M. 2001. Studi Khamir Laut sebagai Sumber Nutrisi Potensial untuk Pakan Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*). Thesis. Program Pasca Sarjana. Universitas Brawijaya. Malang.

- Fox PF, Morrissy PA and Mulvihill DM. 1991. *Chemical and Enzymatic Modification of Food Protein*. London: Development in Food Protein. APPL.Sci.Pbl.
- Girindra, A. 1993. *Biokimia*. PT Gramedia. Jakarta.
- Giyatmi. 2001. Prospek Hidrolisat Protein Ikan sebagai Pemer kaya Nutrisi Makanan. Makalah. Program Pasca Sarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Harli M. 2008. Asam amino esensial. <http://www.suparmas.com>. Dikases pada tanggal 14 Februari 2011.
- Hawab HM. 2007. *Dasar-Dasar Biokimia*. Diadit Media. Jakarta
- Hidayat T. 2011. Profil Asam Amino Kerang Bulu (*Anadara antiquata*). Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Ida B. 2004. *Filsafat Penelitian dan Metode Penelitian Sosial*. Pustaka Pelajar. Jakarta.
- Johnson A H, Peterson M S.1994. *Encyclopedia of Food Technology*. Volume II. Westport: The AVI Publ.Co.Inc.
- Khotim H. 2011. Karakterisa Dialisa Ekstraseluler Khamir Laut Berberat Molekul >10 kDa yang Dialisis pada pH 8,0 dan Aplikasinya dalam Pembuatan Hidrolisat Protein Ikan Peperek (*Leiognathus sp*). Skripsi. Fakultas Perikanan. Universitas Brawijaya. Malang.
- Kinsella, J.E. 1987. Functional Protein from Yeast Nucleoprotein for food uses. In *Food Biotechnology*. Edited by D. Knorr. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Kirk R E, Othmer J B. 1953. *Encyclopedia of Chemical Technology*. New York: *The Interscience Encyclopedia Inc.* **10**: 102-107
- Kreger Van Rij. 1984. *The Yeast a Taxonomic Study*. Third Revised dan Enlarged Edition. Elsevier Science Publisher BV. Amsterdam. 1082pp.
- Lahl,W.J. and Braun, D.B. 1994. Enzymatic Production of Protein Hydrolysis for Food use. *Food Technology*. New York. Hlm 10-31.
- Lehninger, A.L. 1997. *Principles of Biochemistry*. 2nd.Worth Publisher. New York.
- Linder MC. 1992. *Biokimia Nutrisi dan Metabolisme dengan Pemakaian Secara Kimia*. Aminuddin P, Penerjemah. UI Press. Jakarta.
- Mackie, I.M. 1994. Fish Protein. In *New and Developing Sources of Food Proteins*. Edited by B.J.F. Hudson. Champion and Hall. New York.
- Made,A., Saleh.s., Andayani.1996. Kajian Tentang Kualitas Produk Model Aktivitas dan Manfaat Penggunaan Kultur Khamir Dalam Lahan Ternak Ayam.

Direktorat Pembinaan Dan Pengabdian Pada Masyarakat. Dirjen Pendidikan Tinggi. Depdikbud.

Moon, S.H. and S. J. Parulekar. 1993. Some observation on Protease Reducing in continous Suspension Cultures of *Bacillus firmus*. *Biotech. Bioeng.*

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.

Muchtadi, D., S. R. Palupi dan M. Astawan. 1992. *Enzim dalam Industri Pangan*. PAU. Pangan dan Gizi. IPB. Bogor. Hal. 55-58.

Nagahama, T., M. Hamamoto, T., Nakse, H. Takami., and K. Hoikoshi. 2001. Distribution and Identification of Red Yeast in Deep Sea Environment Around the Northwest Pacific Ocean. *Journal. Anthony van Leuwenhoek Journal*. **80** : 101-110.

Naiola E dan Widyastuti. 2002. Isolasi, Seleksi dan Optimasi Produksi Protease dari Beberapa Isolat Bakteri. *Hayati* (6): 467-473

Nakai, S and Modler, H.W. 2000. *Food Proteins Processing Application*. Toronto: Wiley-VCH.

Ni, X., Yue, L., Chi, Z., Li, J. 2009. Alkaline Protease Gene Cloning from the Marine Yeast *Aureobasidium pullulans* HN2-3 and the Protease Surface Display on *Yarrowia lipolytica* for Bioactive Peptide Production. *Marine Biotechnology Springer*. (11): 81-89.

Nuridin, J., Marusin, N., Izmiarti. 2006. Kepadatan Populasi dan Pertumbuhan Kerang Darah *Anadara antiquate* L. (*Bivalvia: Arcidae*) Di Teluk Sungai Pisang, Kota Padang, Sumatera Barat. *Makara Sains*. **10** (2): 96-101.

Nurjanah., Zulhamsyah., dan Kustiyariyah. 2005. Kandungan Mineral dan Proksimat Kerang Darah (*Anadara granosa*) yang Diambil dari Kabupaten Boalemo, Gorontalo. *Buletin Teknologi Hasil Perikanan* **8** (2): 15-24.

Oemarjati dan Wardana, W. 1990. *Taksonomi Avertebrata Pengantar Praktikum Laboratorium*. Universitas Indonesia. Jakarta.

Overseas Fishery Cooperation Foundation OFCF. 1987. *Pengolahan Hasil-hasil Perikanan*. Overseas Fishery Cooperation Foundation. Tokyo.

Pelczar, M.J., and E.C.S., Chan. 1989. *Microbiology*. G. Williamson-W.J.A. Payne Publishers. New York.

Pelczar, M.J., and R.D. Reid. 1965. *Microbiology Second Edition*. Mc. Graw-Hill, Inc. New York.

- Pigott, G. M. and B.W. Tucker. 1990. *Seafood : Effectof Technology Hidrolysis*. Marchel Dekker, Inc. New York.
- Ping, W., C. Zhenming., dan M.A. Chunling. 2006. Alkaline Protease Production by a Strain of Marine Yeast. *Journal of Ocean University of China*. **5** (3): 263-268.
- Poedjiadi A, Supriyanti FMT. 2006. *Dasar-dasar Biokimia*. Universitas Indonesia. Jakarta.
- Porsepwandi W. 1998. *Pengaruh pH larutan perendaman terhadap penurunan kandungan Hg pada kerang hijau (Mytilus viridis)*. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Purbasari, D. 2008. *Produksi dan Karakterisasi Hidrolisat Protein dari Kerang Mas Ngur (Atractodea striata)*. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- PKSPL. 2004. *Penelitian dan Pengembangan Budidaya Perikanan (Kerang darah) di Kabupaten Boalemo Provinsi Gorontalo*. Kerjasama BAPPEDA dan PKSPL. Laporan Penelitian.
- Putranto, W. S. 2006. *Purifikasi dan Karakterisasi Protease yang Dihasilkan Lactobacillus acidophilus dalam Fermentasi Susu Sapi Perah*. Universitas Padjajaran. Bandung.
- Rahayu, K. 1991. *Isolasi dan Pengujian Aktivitas Enzim*. PAU Pangan dan Gizi. UGM Press. Yogyakarta.
- Ramadhan. 2005. *Kerang Darah*. <http://wahyuramadhan.blogspot.com>. Diakses tanggal 29 Maret 2010.
- Reed, Gerald and T.W. Nagodawithana. 1991. *Yeast Technologi*. Second edition. Van Nostrand Reinhold. New York.
- Rao M.B, Tanksale A.M, Mohini S.G, and Deshpande V.V,. 1998. *Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases*. *Microbiology and Molekular Biology Reviews*: hlm. 600-604.
- Schimidi, M.K., Taylor S.L., and Nordlee, J.A. 1994. Use of hydrolysate-based Product in Special Medical Diets. *Journal of Food Technology*. (5): 77-80.
- Sitompul S. 2004. Analisis Asam Amino dalam Tepung Ikan dan Bungkil Kedelai. *Buletin Teknik Pertanian*. Volume IX (1): 33-37.
- Syafii M I. 2011. *Karakteristik Protease Ekstraseluler Khamir Laut dengan Berat Molekul 25 kDa pada pH 8 dan Aplikasinya dalam Pembuatan Hidrolisat Protein Ikan Peperek (Leiognathus sp)*. Skripsi. Fakultas Perikanan. Universitas Brawijaya. Malang.

- Umar H. 1999. Ppetunjuk Lengkap Membuat Skripsi dan Tesis. Rajawali Pers. Jakarta.
- Umbara, H., dan Suseno, H. 2006. Faktor Bioakumulasi ^{210}Pb oleh Kerang Darah (*Anadara granosa*). *Pusat Teknologi Limbah Radioaktif*. hlm. 62-70.
- Walker, G. M. 1998. *Yeast Physiology and Biotechnology*. Inc Production og some enzymat. New York.
- Waluyo, E. 2004. *Analisa Lemak pada Penggunaan Marine Yeast pada Proses Pembuatan Hidrolisat Protein Ikan Peperek (Leiognathus, sp)*. Fakultas Perikanan. Universitas Brawijaya. Malang.
- Ward, O.P. 1983 Proteinases. In Fogatory, W.M. (Ed.). *Microbial Enzyme and Biotechnology*. Applied Science Publisher. New York.
- Williams. 2007. *Teori Pengembangan: Konsep dan Aplikasi*. Pustaka Pelajar. Yogyakarta.
- Winarno, F. G. 2004. *Enzim Pangan*. PT. Gramedia Pustaka Utama. Nuraini, 2002.
- Wiyanto dan Sukoso. 2003. *Bioprospecting Khamir Laut Melalui Pendekatan Fisiologis dan Isolasi DNA Total*. Thesis. Program Pasca Sarjana. Universitas Brawijaya. Malang.
- Wong K.K.Y., Tan L.U.L., Saddler J.N. 1989. *Microbiology*. 52 (3): 305-317.

Lampiran 1. Perhitungan Volume Optimal Khamir Laut

Hasil N total, N terlarut dan Persen DH dari perlakuan Volume Khamir Laut

Volume MY (mL)	N Total (%)	N terlarut (%)	DH (%)
15	0,2992	0,1376	45,98930
30	0,4241	0,2272	53,58490
45	0,5232	0,3488	66,66667
60	0,4142	0,1968	47,51328

Diasumsikan bahwa perlakuan dengan volume khamir laut 15 mL nilai DH adalah 0

Volume MY (mL)	DH (%)
15	0
30	16,51602
45	44,96126
60	3,313772

Dari kurva derajat hidrolisis protein kerang darah dalam berbagai volume khamir laut didapatkan persamaan :

$$y = - 0.064x^2 + 5.102x - 66.10$$

diturunkan menjadi

$$y = - 0.128x + 5.102$$

$$0 = - 0.128x + 5.102$$

$$x = 39.85$$

$$x = 40 \text{ (volume optimal)}$$

$$y = - 0.064 (40)^2 + 5.102 (40) - 66.10$$

$$y = 35.58$$

Dari volume optimal 40 mL diperoleh nilai DH sebesar 35.58%.

Lampiran 2. Perhitungan Waktu Optimal

Hasil N total, N terlarut dan persen DH dari perlakuan waktu inkubasi

Waktu (menit)	N Total (%)	N terlarut (%)	DH (%)
0	0,4856	0,2360	52,92422
40	0,4368	0,3120	71,42857
80	0,3856	0,2800	72,61411
120	0,5728	0,3616	63,12849
160	0,6176	0,3376	54,66321

Diasumsikan bahwa perlakuan dengan waktu 0 menit nilai DH adalah 0

Waktu (menit)	DH (%)
0	0
40	18,50435
80	37,20393
120	19,28091
160	0,06208

Dari kurva derajat hidrolisis protein kerang darah dalam berbagai waktu hidrolisis tersebut didapatkan persamaan :

$$y = -0.005x^2 + 0.802x - 1.179$$

diturunkan menjadi

$$y = -0.01x + 0.802$$

$$0 = -0.01x + 0.802$$

$$x = 80.2$$

$$x = 80 \text{ (waktu optimal)}$$

$$y = -0.005(80)^2 + 0.802(80) - 1.179$$

$$y = 30.981$$

Dari waktu optimal 80 menit diperoleh nilai DH sebesar 30.98%.

Lampiran 3. Perhitungan Suhu Optimal

Hasil N total, N terlarut dan persen DH dari perlakuan suhu inkubasi

Suhu (°C)	N Total (%)	N terlarut (%)	DH (%)
20	0,02959	0,02105	71,135723
30	0,03616	0,02704	74,778761
40	0,53600	0,04240	79,104478
50	0,07104	0,05504	77,477477

Diasumsikan bahwa perlakuan dengan suhu 20 °C merit nilai DH adalah 0

Waktu (menit)	DH (%)
20	0
30	3,643038
40	7,968755
50	6,341754

Dari kurva derajat hidrolisis protein kerang darah dalam berbagai suhu hidrolisis didapatkan persamaan :

$$y = -0.013x^2 + 1.155x - 18.17$$

diturunkan menjadi

$$y = - 0.026x + 1,155$$

$$0 = - 0.026x + 1,155$$

$$x = 44.423$$

$$x = 44 \text{ (Suhu Optimal)}$$

$$y = -0.013(44)^2 + 1.155(44) - 18.17$$

$$y = 7.482$$

Dari suhu optimal 44°C diperoleh nilai DH sebesar 7.48%.

Lampiran 4. Perhitungan pH Optimal

Hasil N total, N terlarut dari persen DH dari perlakuan pH

pH	N Total (%)	N terlarut (%)	DH (%)
10	0,07651	0,04551	59.485364
11	0,05749	0,03724	64.767325
12	0,08094	0,05753	71.077402
13	0,08106	0,05842	72.067304

Diasumsikan bahwa perlakuan dengan pH 10 °C menit nilai DH adalah 0

pH	DH (%)
10	0
11	8.87943
12	19.48721
13	21.15132

Dari kurva derajat hidrolisis protein kerang darah dalam berbagai pH hidrolisis didapatkan persamaan :

$$y = -1.803x^2 + 48.89x - 309.0$$

diturunkan menjadi

$$y = - 3.606x + 48.89$$

$$0 = - 3.606x + 48.89$$

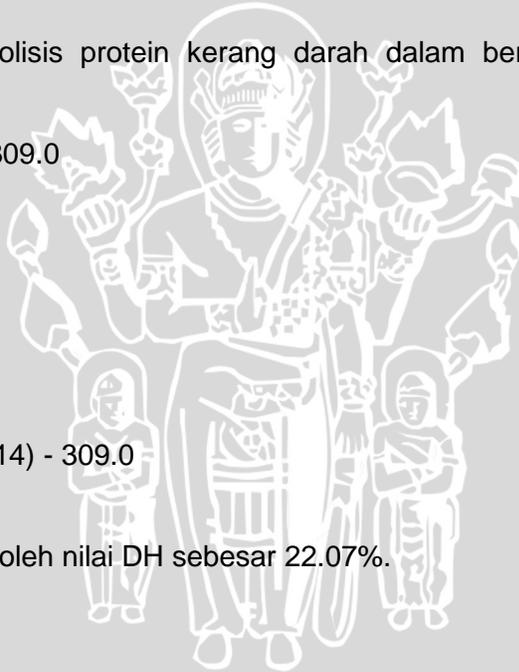
$$x = 13.4$$

$$x = 13 \text{ (pH optimal)}$$

$$y = -1.803(14)^2 + 48.89(14) - 309.0$$

$$y = 22.072$$

Dari pH optimal 13 diperoleh nilai DH sebesar 22.07%.



Lampiran 5. Perhitungan Substrat Optimal

Hasil N total, N terlarut dan DH dari perlakuan pH

Substrat (mL)	N Total (%)	N terlarut (%)	DH (%)
50	0.0422	0,030	71.081081
100	0.0334	0,025	74.761207
150	0.0527	0,040	75.947559
200	0.0441	0,032	72.591244

Diasumsikan bahwa perlakuan dengan pH 10 °C menit nilai DH adalah 0

Substrat (mL)	DH (%)
50	0
100	5.177364
150	6.846377
200	2.124564

Dari kurva derajat hidrolisis protein kerang darah dalam berbagai volume substrat didapatkan persamaan :

$$y = -0.001x^2 + 0.263x - 10.84$$

diturunkan menjadi

$$y = -0.002x + 0.263$$

$$0 = -0.002x + 0.263$$

$$x = 131.5$$

$$x = 131 \text{ (Substrat optimal)}$$

$$y = -0.001(131)^2 + 0.263(131) - 10.84$$

$$y = 6.452$$

Dari substrat optimal 131 mL diperoleh nilai DH sebesar 6.45%.

Lampiran 6. Perhitungan Kadar Asam Amino Kerang Darah

$$\text{Kadar asam amino} = \frac{\text{Luasarea sampel}}{\text{Luasarea standar}} \times [\text{konsentrasi standar}]$$

Konsentrasi standart = 100 pmol

Volume injeksi sampel = volume injeksi standart = 5 μL

NO	Asam Amino	Luas Area Sampel	Luas Area Standart	$\frac{\text{Luasarea sampel}}{\text{Luasarea standar}}$	Kadar (pmol)
1	Aspartat	1593569	4844959	0.3289128	32.891279
2	Serin	1580413	7646016	0.2066976	20.669758
3	Glutamat	1987479	5309606	0.3743176	37.43176
4	Glisin	2104587	6670586	0.3155026	31.550257
5	Histidin	583933	9846704	0.0593024	5.9302382
6	Arginin	1343360	9109743	0.1474641	14.746409
7	Threonin	1382662	9417585	0.146817	14.681704
8	Alanin	3738883	8900182	0.4200906	42.009062
9	Prolin	494842	4725187	0.1047243	10.472432
10	Cystine	-	1069081	-	-
11	Tirosin	783178	10844639	0.072218	7.2217987
12	Valin	2976455	18019865	0.1651763	16.517632
13	Methionin	791929	14947663	0.0529801	5.2980121
14	Lisin	22379611	19044177	1.1751419	117.51419
15	Isoleusin	3096626	23269266	0.1330779	13.307794
16	Leusin	5224584	24434223	0.2138224	21.382239
17	Phenilalanin	2938254	31577861	0.0930479	9.3047911
18	Triptofan	-	1760776	-	-

Untuk mendapatkan konsentrasi asam amino dalam $\mu\text{g/g}$ yaitu :

Misal untuk aspartat :

- Dalam 5 μL sampel mengandung 32.891279 pmol asam amino
- Dalam 5 μL sampel mengandung 4377.829×10^{-6} μg asam amino
- Dalam 1 mL sampel mengandung 0.875566 μg asam amino
- Dalam 1 gr sampel mengandung 0.875566 μg asam amino

Profil AA	Pmol/5 μL	$\mu\text{g}/5\mu\text{L}$ (10^{-6})	$\mu\text{g}/\text{mL}$	$\mu\text{g}/\text{g}$
Aspartat	32.891279	4377.829	0.875566	0.875566
Serin	20.669758	2172.185	0.434437	0.434437
Glutamat	37.43176	5507.335	1.101467	1.101467
Glisin	31.550257	2368.478	0.473696	0.473696
Histidin	5.9302382	920.0765	0.184015	0.184015
Arginin	14.746409	2568.825	0.513765	0.513765
Threonin	14.681704	1748.885	0.349777	0.349777
Alanin	42.009062	3742.587	0.748517	0.748517
Prolin	10.472432	1205.691	0.241138	0.241138
Cystine	-	-	-	-
Tirosin	7.2217987	1308.518	0.261704	0.261704
Valin	16.517632	1935.041	0.387008	0.387008
Methionin	5.2980121	790.5164	0.158103	0.158103
Lisin	117.51419	17179.4	3.43588	3.43588
Isoleusin	13.307794	1745.583	0.349117	0.349117
Leusin	21.382239	2804.708	0.560942	0.560942
Phenilalanin	9.3047911	1537.058	0.307412	0.307412
Triptofan	-	-	-	-

Lampiran 7. Perhitungan Kadar Asam Amino Hidrolisat Protein Kerang Darah

$$\text{Kadar asam amino} = \frac{\text{Luasarea sampel}}{\text{Luasarea standar}} \times [\text{konsentrasi standar}]$$

Konsentrasi standart = 100 pmol

Volume injeksi sampel = volume injeksi standart = 5 µL

NO	Asam Amino	Luas Area Sampel	Luas Area Standart	$\frac{\text{Luasarea sampel}}{\text{Luasarea standar}}$	Kadar (pmol)
1	Aspartat	1910516	4844959	0.39433068	39.433068
2	Serin	5156412	7646016	0.674392	67.4392
3	Glutamat	1022241	5309606	0.19252671	19.252671
4	Glisin	2845176	6670586	0.42652565	42.652565
5	Histidin	735581	9846704	0.07470327	7.4703271
6	Arginin	445377	9109743	0.04889018	4.8890183
7	Threonin	1626632	9417585	0.17272284	17.272284
8	Alanin	5197139	8900182	0.58393626	58.393626
9	Prolin	781020	4725187	0.1652887	16.52887
10	Cystine	605513	1069081	0.56638646	56.638646
11	Tirosin	619671	10844639	0.05714077	5.7140768
12	Valin	1828763	18019865	0.10148594	10.148594
13	Methionin	57633	14947663	0.00385565	0.3855653
14	Lisin	22716376	19044177	1.19282529	119.28253
15	Isoleusin	1724333	23269266	0.07410345	7.4103455
16	Leusin	2060961	24434223	0.08434731	8.4347311
17	Phenilalanin	1221060	31577861	0.03866823	3.866823
18	Triptofan	-	1760776	-	-

Untuk mendapatkan konsentrasi asam amino dalam gr/gr yaitu :

Misal untuk aspartat :

- Dalam 5 μL sampel mengandung 39.433068 pmol asam amino
- Dalam 5 μL sampel mengandung $5248.541 \cdot 10^{-6}$ μg asam amino
- Dalam 1 mL sampel mengandung 1.049708 μg asam amino
- Dalam 1 mL sampel mengandung 1.049708×10^{-6} μg asam amino
- Dalam 1 gr sampel mengandung 1.049708×10^{-6} μg asam amino

Profil AA	Pmol/5 μL	$\mu\text{g}/5\mu\text{L}$ (10^{-6})	$\mu\text{g}/\text{mL}$	$\mu\text{g}/\text{g}$
Aspartat	39.433068	5248.541	1.049708	1.049708
Serin	67.4392	7087.185	1.417437	1.417437
Glutamat	19.252671	2832.646	0.566529	0.566529
Glisin	42.652565	3201.928	0.640386	0.640386
Histidin	7.4703271	1159.021	0.231804	0.231804
Arginin	4.8890183	851.667	0.170333	0.170333
Threonin	17.272284	2057.474	0.411495	0.411495
Alanin	58.393626	5202.288	1.040458	1.040458
Prolin	16.52887	1902.969	0.380594	0.380594
Cystine	56.638646	9947.445	1.989489	1.989489
Tirosin	5.7140768	1035.334	0.207067	0.207067
Valin	10.148594	1188.908	0.237782	0.237782
Methionin	0.3855653	57.5302	0.011506	0.011506
Lisin	119.28253	17437.91	3.487583	3.487583
Isoleusin	7.4103455	972.015	0.194403	0.194403
Leusin	8.4347311	1106.384	0.221277	0.221277
Phenilalanin	3.866823	638.7605	0.127752	0.127752
Triptofan	-	-	-	-