

**KARAKTERISTIK EKSTRASELULAR KHAMIR LAUT  
YANG DIPANEN PADA FASE LOG DAN AKTIVITAS HIDROLISISNYA  
TERHADAP KUALITAS PROTEIN IKAN PEPEREK (*Leiognathus sp.*)**

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

Oleh :  
**YENDI RIZKA REVIANDINI AKILI  
NIM. 0810833010**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2012**

**KARAKTERISTIK EKSTRASELULAR KHAMIR LAUT  
YANG DIPANEN PADA FASE LOG DAN AKTIVITAS HIDROLISISNYA  
TERHADAP KUALITAS PROTEIN IKAN PEPEREK (*Leiognathus* sp.)**

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

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

**Oleh :  
YENDI RIZKA REVIANDINI AKILI  
NIM. 0810833010**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2012**

**SKRIPSI**

**KARAKTERISTIK EKSTRASELULAR KHAMIR LAUT  
YANG DIPANEN PADA FASE LOG DAN AKTIVITAS HIDROLISISNYA  
TERHADAP KUALITAS PROTEIN IKAN PEPEREK (*Leiognathus sp.*)**

Oleh :  
**YENDI RIZKA REVIANDINI AKILI**  
NIM. 0810833010

telah dipertahankan didepan penguji  
pada tanggal 17 Oktober 2012  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui

Dosen Penguji I

**(Dr. Ir. Dwi Setijawati, M.Kes.)**  
NIP. 19611022 198802 2 001  
Tanggal :

Dosen Pembimbing I

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

Dosen Penguji II

**(Dr. Ir. Kartini Zaelani, MP)**  
NIP. 19550503 198503 2 001  
Tanggal :

Dosen Pembimbing II

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

Mengetahui,  
Ketua Jurusan Manajemen Sumberdaya Perairan

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



## PERNYATAAN ORISINALITAS

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali yang tertulis dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 23 Oktober 2012

Mahasiswa

Yendi Rizka Reviandini Akili



## UCAPAN TERIMAKASIH

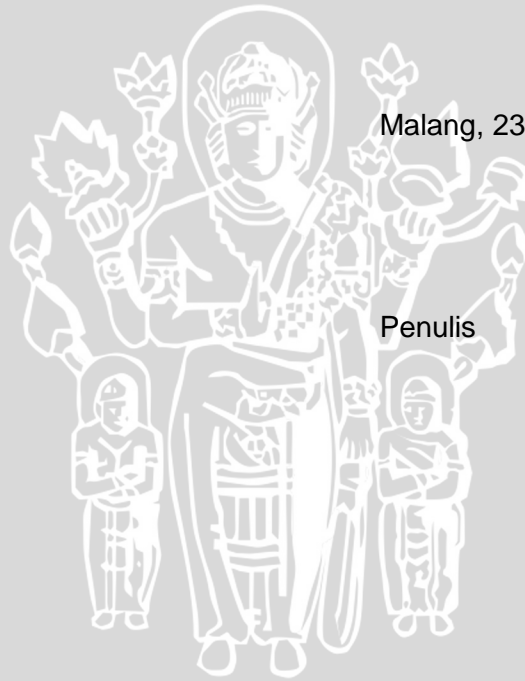
Penulis ingin menyampaikan ucapan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. ALLAH SWT, karena dengan kehendak-Nya dan kebesaran-Nyalah saya dipertemukan dengan orang-orang yang begitu hebat dalam hidup ini.
2. Ayah, ibu, dan adik serta keluarga yang sangat saya cintai karena dengan doa yang selalu dipanjatkan memberi kemudahan atas segala urusan saya. Dan juga cinta dan motivasi yang begitu besar yang membuat saya tetap optimis dalam menyelesaikan suatu masalah.
3. Bapak Prof. Ir. Sukoso, M.Sc., Ph.D, selaku pembimbing 1 saya karena telah banyak memberikan ilmu serta masukan-masukan kepada saya selama saya menjalankan penelitian hingga selesai. Dan juga telah membiayai penelitian saya dan memberikan koleksi khamir laut yang sangat membantu dalam kelancaran pelaksanaan penelitian saya.
4. Bapak Dr. Ir. Muhamad Firdaus, MP, selaku pembimbing 2 saya karena telah memberikan pengetahuan dan membimbing saya dengan sabar dimulai dari saya yang tidak paham hingga bisa memahami materi penelitian saya.
5. Ibu Dr. Ir. Dwi Setijawati, M.Kes. dan Ibu Dr. Ir. Kartini Zaelani, MP, selaku penguji saya yang telah banyak memberikan masukan-masukan yang sangat membangun bagi laporan skripsi saya.
6. Ibu Rahmi Nurdiani, M.App.Sc., selaku pembimbing akademik saya, yang selalu memberikan masukan-masukan serta motivasi yang membuat saya tetap semangat dalam menjalankan kegiatan perkuliahan.

7. Mbak Heni Triwahyuni, A.Mk., selaku laboran yang selalu mendampingi dan mengajari saya selama pelaksanaan penelitian di Laboratorium Biomedik, Fakultas Kedokteran.
8. Sahabat saya Devi, Dewi, Inggrid, Kiki, Dasti, Alif, Ami, Laras, Yayu, Yuli, Wila, Ayu, Rizki, Fitriani, Arifah, Anna, dan masih banyak lagi yang tidak bisa disebutkan satu per satu. Terimakasih atas semua dukungan dan doa yang tak henti-hentinya sehingga saya bisa bangkit dan menyelesaikan setiap masalah yang ada.

Malang, 23 Oktober 2012

Penulis





## RINGKASAN

**YENDI RIZKA REVIANDINI AKILI.** Karakterisasi Ekstraselular Khamir Laut yang Dipanen pada Fase Log dan Aktivitas Hidrolisisnya terhadap Protein Ikan Peperek (*Leiognathus* sp.) (dibawah bimbingan **Prof. Ir. SUKOSO, M.Sc., Ph.D** dan **Dr. Ir. MUHAMAD FIRDAUS, MP**)

---

Khamir laut memiliki peran penting yakni sebagai penghasil enzim ekstraselular seperti protease, amilase, lipase, dan fitase. Dari enzim-enzim yang telah ditemukan, protease merupakan enzim yang mendominasi 65% dari total pemasaran enzim di dunia. Protease dapat menghidrolisis protein suatu bahan menjadi senyawa-senyawa sederhana seperti peptida dan asam amino. Salah satu aplikasi protease dalam dunia industri adalah dalam pembuatan hidrolisat protein ikan. Manfaat hidrolisat protein ikan antara lain sebagai suplemen makanan, kosmetik, dan bahan pengemulsi.

Penelitian sebelumnya oleh Syafii (2011) menggunakan khamir laut yang dipanen pada hari ke 7-10 dan diperoleh aktivitas ekstraselular khamir laut yang masih rendah. Oleh karena itu pada penelitian ini digunakan khamir laut yang dipanen pada fase log, karena pada fase ini jumlah sel khamir laut yang tumbuh sangat banyak dan merupakan waktu yang tepat bagi sel ini untuk memproduksi enzim ekstraselular.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui karakteristik ekstraselular khamir laut yang dipanen pada fase log dan mengetahui aktivitasnya dalam menghidrolisis protein ikan peperek (*Leiognathus* sp.). Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah metode eksploratif yang merupakan metode penelitian dengan mencari ide atau hubungan-hubungan baru yang didasari pada hasil penelitian sebelumnya.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa waktu fase log dari khamir laut yakni pada jam ke-48 dengan konsentrasi protein sebesar 121 mg/mL, aktivitas 0,2112 U/mL/menit, dan aktivitas spesifik sebesar 1,745 U/mg,  $K_M$  sebesar  $1,4255 \times 10^3$  mM, serta  $V_{maks}$  sebesar 0,0594 mmol/menit/mg. Untuk hasil aktivitas hidrolisis ekstraselular khamir laut yang dipanen pada jam ke-48 diperoleh optimasi waktu selama 59 menit, suhu sebesar 50°C, pH yakni 10, dan konsentrasi substrat sebesar 0,4%. Berat molekul yang dihasilkan oleh hidrolisat protein ikan peperek berkisar antara 17 kDa – 140 kDa. Asam amino yang dihasilkan ada 15 asam amino, yakni treonin, tirosin, valin, metionin, isoleusin, leusin, fenilalanin, asam aspartat, serin, asam glutamat, glisin, histidin, arginin, alanin, dan prolin. Ekstraselular khamir laut yang dipanen pada jam ke-48 tergolong protease serin, karena memiliki kandungan asam amino serin yang lebih tinggi dibandingkan asam amino lainnya.

Berdasarkan penelitian ini, disarankan untuk dilakukan penelitian selanjutnya mengenai pemurnian protease ekstraselular untuk memperoleh protease yang lebih murni, dan juga mengenai karakteristik protease yang meliputi aktivator, inhibitor, dan kofaktor untuk memperoleh informasi yang lebih lengkap mengenai karakteristik protease yang diteliti.

## KATA PENGANTAR

Segala puji syukur hanya kepada Allah SWT, karena atas karunia-Nya saya dapat menyelesaikan pembuatan laporan skripsi dengan judul **“Karakteristik Ekstraselular Khamir Laut yang Dipanen pada Fase Log dan Aktivitas Hidrolisisnya Terhadap Kualitas Protein Ikan Peperek (*Leiognathus* sp.)”**. Laporan skripsi ini membahas tentang karakterisasi ekstraselular dari khamir laut serta aktivitasnya dalam menghidrolisis protein ikan peperek (*Leiognathus* sp.) dengan menggunakan masa panen optimum dari khamir laut yakni pada fase log.

Saya menyadari sepenuhnya bahwa penyusunan laporan skripsi ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu, penulis mengharapkan saran dan kritik yang bersifat membangun demi kesempurnaan penyusunan skripsi berikutnya. Semoga laporan skripsi ini bermanfaat bagi para pembaca.

Malang, Oktober 2012

Penulis



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
LEMBAR PENGESAHAN .....	ii
PERNYATAAN ORISINALITAS .....	iii
UCAPAN TERIMA KASIH.....	iv
KATA PENGANTAR .....	vii
DAFTAR ISI .....	viii
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN .....	xii
<b>1.PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1Latar belakang .....	1
1.2Rumusan Masalah .....	3
1.3Tujuan Penelitian .....	4
1.4Hipotesa.....	5
1.5Manfaat.....	5
1.6Tempat dan Waktu Penelitian .....	5
<b>2.TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>6</b>
2.1Khamir Laut.....	6
2.2Ikan Peperek ( <i>Leiognathus</i> sp.).....	9
2.3Protease.....	10
2.4Hidrolisat Protein Ikan .....	13
2.5.....	15
olasi dan Pemurnian Protease.....	15
<b>3.MATERI DAN METODE PENELITIAN.....</b>	<b>19</b>
3.1Materi Penelitian .....	19
3.1.1.....	19
han dan Alat Penelitian.....	19
3.2Metode Penelitian.....	21
3.3Prosedur Penelitian.....	21
3.3.1 Kultur dan Pemurnian Ekstraselular Khamir Laut .....	22

3.3.2 Karakterisasi Ekstraselular Khamir Laut .....	28
3.3.3 Karakterisasi Aktivitas Hidrolisis Ekstraselular Khamir Laut.....	36

**4. HASIL DAN PEMBAHASAN**

4.1 Isolasi dan Penentuan Masa Pertumbuhan Optimum Khamir Laut	45
4.2 Karakteristik Ekstraselular Khamir Laut .....	49
4.2.1 Konsentrasi Protein Ekstraselular Khamir Laut.....	50
4.2.2 Aktivitas Ekstraselular Khamir Laut .....	50
4.2.3 .....	Ki
netika Ekstraselular Khamir Laut .....	51
4.3 Karakteristik Aktivitas Hidrolisis Ekstraselular Khamir Laut.....	53
4.3.1 Derajat Hidrolisis .....	53
4.3.1.1 Optimasi Waktu .....	53
4.3.1.2 Perlakuan Suhu .....	55
4.3.1.3 Optimasi pH.....	56
4.3.1.4 Optimasi Konsentrasi Substrat .....	57
4.3.2 Berat Molekul .....	58
4.3.3 Profil Asam Amino.....	63
<b>5. PENUTUP</b> .....	68
5.1 Kesimpulan.....	68
5.2 Saran.....	68
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	69
<b>LAMPIRAN</b> .....	77



DAFTAR TABEL

	Hal.
1. Komposisi Kimia Ikan Peperek per 100 gram.....	10
2. Perbandingan Daging Ikan Dan Daging Sapi .....	14
3. Pembuatan Standar BSA.....	29
4. Prosedur Kerja Penentuan Aktivitas Ekstraselular Khamir Laut .....	32
5. Pembuatan Konsentrasi Substrat Ikan Peperek.....	34
6. Perbandingan Konsentrasi Ekstraselular Khamir Laut dan Substrat Ikan Peperek .....	38
7. Komposisi Gel Pemisah ( <i>separating gel</i> ) (12,5%) .....	40
8. Komposisi Gel Pengumpul ( <i>stacking gel</i> ) (12,5%).....	40
9. Pembuatan Larutan <i>Destaining</i> .....	40
10. Pembuatan larutan <i>Staining</i> .....	41
11. Karakteristik Ekstraselular Khamir Laut.....	49
12. Berat Molekul (kDa) Pita Protein Ikan Peperek dan Hidrolisat Protein Ikan Peperek yang Dihidrolisis dengan Ekstraselular Khamir Laut.....	60
13. Kadar asam amino ikan peperek dan hidrolisat protein ikan peperek .....	63

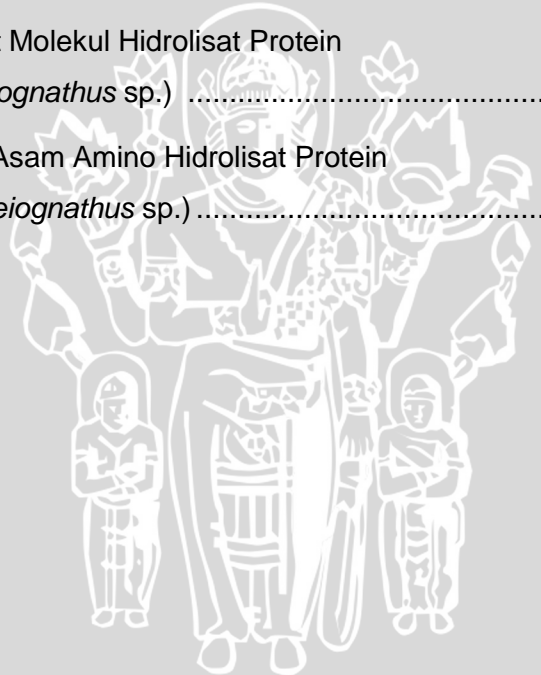


DAFTAR GAMBAR

	Hal.
1. Ikan Peperek ( <i>Leiognathus</i> sp.).....	9
2. Sel Khamir Laut pada Jam ke-24, 48, dan 72 dengan perbesaran 1000x.....	45
3. Tingkat Kekeruhan (Turbiditas) Khamir Laut pada Masa Kultur.....	47
4. Lineweaver-Burk Ekstraselular Khamir Laut.....	52
5. Derajat Hidrolisis Protein Ikan Peperek oleh Ekstraselular Khamir Laut pada Berbagai Waktu Hidrolisis.....	54
6. Derajat Hidrolisis Protein Ikan Peperek oleh Ekstraselular Khamir Laut pada Berbagai Suhu Hidrolisis.....	55
7. Derajat Hidrolisis Protein Ikan Peperek oleh Ekstraselular Khamir Laut pada Berbagai pH Hidrolisis.....	56
8. Derajat Hidrolisis Protein Ikan Peperek oleh Ekstraselular Khamir Laut dalam Berbagai Konsentrasi Substrat.....	57
9. Pita Protein Marker, Ikan Peperek, dan Hidrolisat Protein Ikan Peperek.....	59

DAFTAR LAMPIRAN

	Hal.
1. Perhitungan Konsentrasi Protein Ekstraselular Khamir Laut yang Dipanen pada Jam ke-48 .....	77
2. Perhitungan Konsentrasi Protein Ekstraselular Khamir Laut yang Dipanen pada Jam ke-48 .....	79
3. Perhitungan Kinetika Ekstraselular Khamir Laut yang Dipanen pada Jam ke-48 .....	80
4. Perhitungan Derajat Hidrolisis Ekstraselular Khamir Laut Terhadap Hidrolisat Protein Ikan Peperek ( <i>Leiognathus</i> sp.) .....	85
5. Perhitungan Berat Molekul Hidrolisat Protein Ikan Peperek ( <i>Leiognathus</i> sp.) .....	94
6. Penentuan Profil Asam Amino Hidrolisat Protein Ikan Peperek ( <i>Leiognathus</i> sp.) .....	97



## 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Khamir laut merupakan khamir yang mampu hidup di lingkungan bersalinitas tinggi (air laut) (Kohlmeyer dan Kohlmeyer, 1979). Khamir laut diisolasi dari perairan laut dan tumbuh dengan baik dalam media air laut dibandingkan media air tawar (Chi 2009). Populasi khamir laut yang tersebar luas di lingkungan perairan membuatnya memiliki potensi pendayagunaan yang tinggi. Salah satu peranan penting khamir laut yakni sebagai penghasil enzim yang dapat mengkatalis karbohidrat, lemak, dan protein dari suatu bahan pangan (Febriani, 2008).

Enzim pada umumnya dikelompokkan dalam dua tipe, yaitu enzim ekstraselular (berfungsi di luar sel) dan enzim intraselular (berfungsi di dalam sel). Sebagian besar enzim mikroba yang dihasilkan secara komersial adalah enzim ekstraselular (Sutandi, 2003). Fungsi utama enzim ekstraselular adalah mengubah nutrien disekitarnya sebagai kebutuhan nutrisi untuk metabolisme yang akan dilakukan di dalam sel. Sedangkan enzim intraselular merupakan enzim yang melakukan proses metabolisme di dalam sel itu sendiri. Enzim-enzim ekstraselular yang dihasilkan khamir laut meliputi amilase, protease basa, protease asam, fitase, lipase, inulinase, dan toksin pembunuh (Chi *et al.*, 2009).

Protease ekstraselular merupakan enzim yang dapat menghidrolisis protein menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana seperti peptida rantai pendek dan asam amino (Naiola dan Widhyastuti, 2002). Protease yang dihasilkan oleh mikroorganisme merupakan enzim yang memiliki nilai produksi tinggi, yakni sebesar 65% dibandingkan dengan enzim lainnya (Akcan *et al.*, 2011). Selain itu, protease yang berasal dari mikroba dapat dihasilkan dalam jumlah yang cukup besar dengan waktu pertumbuhan yang singkat melalui



pengkonsidian pertumbuhannya, dan rekayasa genetik, serta hanya menghabiskan sedikit biaya (Kosim dan Putra, 2010). Sebagian besar dari enzim ini dapat aktif pada kisaran suhu 40-55°C (Abdullah, 2006).

Protease dapat diisolasi melalui metode sentrifugasi untuk menghasilkan ekstrak kasar enzim. Ekstrak kasar enzim ini masih mengandung unsur-unsur lain seperti protein pengotor dan masih banyak lagi sehingga perlu dilakukan pemurnian untuk memperoleh enzim yang lebih pekat. Pemurnian enzim dapat dilakukan berdasarkan sifat-sifat enzim substrat protein yang berbeda dalam hal kelarutan, muatan, dan ukuran atau berat molekulnya (Lehninger, 1988). Metode pemurnian enzim yang sering digunakan adalah pengendapan dengan variasi konsentrasi garam yang dilakukan secara bertingkat (fraksional) (Aulanni'am, 2005). Dari metode pengendapan bertingkat, dilanjutkan dengan proses dialisis dengan tujuan untuk mengeluarkan garam yang tersisa pada endapan enzim (Deutscher, 1990).

Protease ekstraselular banyak digunakan dalam aplikasi industri, salah satunya dalam pembuatan hidrolisat protein (Pakpahan 2009). Pembuatan hidrolisat protein dapat menggunakan berbagai macam bahan baku sebagai sumber protein yang akan dihidrolisis, salah satunya ikan yang dikenal dengan hidrolisat protein ikan. Pada proses menghidrolisis protein pada ikan, protease berperan dalam menguraikan protein ikan menjadi senyawa-senyawa berantai pendek yang disebut sebagai hidrolisis secara enzimatis.

Hidrolisis protein secara enzimatis dikenal paling efisien karena enzim menghasilkan peptida yang tinggi dan kurang kompleks serta mudah dipecah-pecah. Disamping itu, hidrolisis secara enzimatis akan menghasilkan produk hidrolisat protein 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. Asam amino yang dapat dihasilkan oleh protein yang terhidrolisis secara sempurna adalah sebanyak 18 sampai 20 jenis asam amino (Ariyani, 2003). Aplikasi hidrolisat protein ikan dalam industri pangan maupun farmasi, diantaranya digunakan sebagai suplemen makanan, kosmetik, dan bahan pengemulsi (Hidayat, 2005).

Penelitian sebelumnya oleh Syafii (2011) mengenai karakterisasi dialisat ekstraselular khamir laut dengan masa panen 7-10 hari memiliki konsentrasi protein, aktivitas enzim dan aktivitas spesifik enzim masing-masing sebesar 70,5 mg/mL, 67 mU/mL/menit, dan 0,950 mU/mg. Selanjutnya perolehan optimasi waktu, suhu, dan pH yang diunakan dalam menghidrolisis protein ikan peperek masing-masing diperoleh selama 62 menit, suhu 50°C, pada pH 9 yang merupakan kondisi basa.

Berdasarkan hasil tersebut, peneliti hendak menggunakan masa kultur optimum dari khamir laut yakni pada fase log. Fase log merupakan fase pertumbuhan dimana terjadi perbanyakan jumlah sel yang sangat tinggi. Pada fase ini, jumlah sel mikroba sangat banyak, sehingga aktivitas sel juga ikut meningkat. Selain itu, pada awal fase ini merupakan saat yang baik untuk menghasilkan enzim-enzim mikroba (Gandjar, 2006). Oleh karena itu peneliti mengharapkan pada penggunaan masa kultur optimum dari khamir laut dapat memperoleh karakteristik ekstraselular khamir laut yang lebih baik dari penelitian sebelumnya serta dapat menghidrolisis protein ikan peperek (*Leiognathus* sp.) dengan optimasi waktu, suhu, pH, dan konsentrasi substrat yang lebih baik.

## 1.2 Rumusan Masalah

Khamir laut memiliki peranan penting sebagai penghasil protease ekstraselular (Febriani, 2008). Keunggulan dari protease yang berasal dari mikroorganisme yakni produksi enzim yang cukup besar dengan waktu



pertumbuhan yang singkat melalui pengkonsidian pertumbuhannya, dan rekayasa genetik, serta hanya menghabiskan sedikit biaya (Kosim dan Putra, 2010). Protease ekstraselular sangat penting dalam proses hidrolisis protein yang dapat menghasilkan produk hidrolisat (Gupta *et al.*, 2002), salah satunya hidrolisat protein ikan yang berperan penting dalam industri pangan maupun farmasi, diantaranya digunakan sebagai suplemen makanan, kosmetik, dan bahan pengemulsi (Hidayat, 2005).

Penelitian sebelumnya menggunakan biakan khamir laut yang dipanen pada hari ke 7-10, dengan menentukan karakterisasi dialisat ekstraselular khamir laut serta aplikasinya terhadap hidrolisat protein ikan peperek (*Leiognathus* sp.). Berdasarkan penelitian sebelumnya, peneliti hendak menggunakan khamir laut yang memiliki masa kultur optimum yakni pada fase log. Hal ini dikarenakan pada fase log terjadi perbanyakan jumlah sel yang sangat tinggi dan menyebabkan peningkatan aktivitas sel. Oleh karena itu diharapkan dengan menggunakan khamir laut yang dipanen pada fase log dapat menghasilkan ekstraselular khamir laut yang memiliki karakteristik yang lebih baik dan memiliki kemampuan menghidrolisis protein ikan peperek dengan lebih baik pula.

### 1.3 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui karakteristik ekstraselular khamir laut yang dipanen pada fase log, yang meliputi konsentrasi protein, aktivitas enzim, dan kinetika enzim.
2. Mengetahui karakteristik aktivitas hidrolisis ekstraselular khamir laut yang dipanen pada fase log terhadap protein ikan peperek (*Leiognathus* sp.), dengan melihat kondisi optimasi dari waktu, suhu, pH, dan konsentrasi substrat, serta berat molekul dan profil asam amino.



#### 1.4 Hipotesa

1. Ekstraselular khamir laut yang dipanen pada fase log memiliki karakteristik yang lebih baik dibandingkan dengan ekstraselular khamir laut yang dipanen pada hari ke 7-10.
2. Ekstraselular khamir laut yang dipanen pada fase log dapat menghidrolisis protein dari ikan peperek (*Leiognathus* sp.) dengan lebih optimal dibandingkan dengan ekstraselular khamir laut yang dipanen pada hari ke 7-10.

#### 1.5 Manfaat

1. Sebagai tambahan ilmu pengetahuan mengenai potensi khamir laut khususnya dalam menghasilkan ekstraselular khamir laut serta aplikasinya dalam menghidrolisis protein.
2. Sebagai tambahan informasi mengenai pentingnya penanganan ikan yang masih bernilai ekonomis rendah (ikan rucah), karena pada ikan-ikan tersebut masih terdapat kandungan nutrisi yang cukup tinggi, terutama kandungan protein.

#### 1.6 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Universitas Brawijaya, Malang yang bertempat di Laboratorium Ilmu-ilmu Perairan (IIP) dan Laboratorium Mikrobiologi Dasar, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Laboratorium Biologi dan Medikal (Biomedik), Fakultas Kedokteran, Laboratorium Kimia Organik Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (MIPA), serta Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH), pada bulan April 2012 sampai dengan Juli 2012.

## 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Khamir Laut

Khamir atau yeast merupakan mikroba bersel satu yang bersifat mikroskopik berbentuk bulat (sferoid), elips, batang atau silindris, dan tidak mempunyai flagel tetapi beberapa jenis tertentu dapat membentuk filamen (*pseudomisellium*) (Campbell and Priest, 1996). *Pseudomisellium* adalah sel-sel tunas khamir yang memanjang dan tidak melepaskan diri dari induknya, dan saling berhubungan, misalnya pada *Candida* dan *Pichia* (Wood, 1998). Khamir mempunyai ciri morfologi mikroskopis, membentuk spora bulat lonjong, silindris, oval atau bulat telur pendek (Ahmad, 2008).

Bhat and Kachwalla (1954) mengatakan bahwa morfologi khamir laut secara umum yakni berbentuk bulat hingga oval, berpasangan dan ada pula yang tidak berpasangan yang membentuk suatu kumpulan sel. Selain itu sel-sel yang dihasilkan menunjukkan reproduksi aseksual dengan pertunasan (*budding*). Chi *et al* (2007) juga mengatakan bahwa sel tunggal sebagai sel induk akan menghasilkan sel anak melalui proses pertunasan.

Khamir adalah jamur yang tahap siklus kehidupannya berasal dari sel-sel tunggal dan sebagian besar berkembang biak secara aseksual melalui pertunasan (*budding*) (Nurhariyati, dkk, 2004). Khamir juga dapat berkembang biak secara seksual dengan cara membentuk spora (Febriani, 2008). Kutty and Phillip (2008) mengatakan bahwa sebagian dari khamir bereproduksi secara seksual dengan membentuk askospora dan sebagian lainnya dengan teliospora serta basidiospora. Pada khamir yang membentuk askospora, taksonomi diberikan berdasarkan pembentukan sel vegetatif, konjugasi antara dua sel, dan sel induk yang berkonjugasi dengan tunasnya. Pada khamir yang berkembang



biak dengan membentuk filamen seperti rantai maupun tandan dapat digunakan untuk membedakan genus.

Gandjar dan Sjamsuridzal (2006) juga menambahkan bahwa khamir memiliki beberapa tipe reproduksi aseksual yang dikenal sebagai pertunasan (*budding*) atau juga dikenal sebagai konidiogenesis, pembelahan (*fission*) atau produksi konidia pada tangkai pendek (*sterigmata*). Pertunasan diawali dengan pembentukan evaginasi kecil pada beberapa titik pada permukaan sel. Ukuran sel induk tetap sedangkan sel anak bertambah besar sampai pada suatu saat dilepaskan dari sel induk. Bhat and Kachwalla (1954) mengatakan bahwa secara umum reproduksi yang dilakukan oleh khamir laut yakni reproduksi secara vegetatif dengan pertunasan (*budding*). Chi *et al* (2007) juga mengatakan bahwa pada khamir laut, sel tunggal sebagai sel induk akan menghasilkan sel anak melalui proses pertunasan.

Khamir dapat tumbuh dan berkembang biak dengan memanfaatkan heksosa monosakarida seperti glukosa, fruktosa, manosa, dan galaktosa sebagai substrat pertumbuhan. Habitat dari berbagai jenis khamir yakni di darat, perairan tawar maupun laut (Febriani, 2008). Pada penelitian kali ini, digunakan khamir yang habitatnya berasal dari wilayah perairan laut, karena dilihat dari segi geografis, 71% permukaan bumi diisi oleh perairan (Chi *et al.*, 2009) ditambah lagi Indonesia merupakan negara kepulauan yang dikelilingi oleh laut sehingga khamir laut memiliki potensi pendayagunaan yang tinggi.

Khamir laut merupakan khamir yang mampu hidup di lingkungan bersalinitas tinggi (air laut) (Kohlmeyer dan Kohlmeyer, 1979). Khamir laut dibagi menjadi kelompok obligat dan fakultatif. Khamir laut dalam kelompok obligatif merupakan khamir yang diisolasi hanya dari lingkungan laut, sedangkan khamir laut kelompok fakultatif dapat berasal dari daratan (Burgaud, 2010) atau lingkungan lainnya seperti sungai, tanah, kayu atau pada permukaan tubuh



hewan yang berpindah ke lingkungan laut. Salah satu karakter utama dari khamir laut yakni memiliki kandungan NaCl yang tinggi dan memiliki fenotip sebagai pembawaannya (Urano *et al.*, 2001).

Khamir laut merupakan sumber dari enzim serta gen yang dibutuhkan. Hal ini sesuai dengan pernyataan Febriani (2008), bahwa salah satu peranan penting khamir laut yakni sebagai penghasil enzim yang dapat mengkatalis karbohidrat, lemak, dan protein dari suatu bahan pangan. Mikroorganisme ini diisolasi dari lingkungan laut dan dapat tumbuh dengan baik pada media air laut yang telah disediakan dibandingkan pada media air tawar. Sehingga apabila khamir laut dapat digunakan sebagai penghasil enzim untuk kebutuhan industri, maka air laut dapat digunakan sebagai media fermentasi.

Adapun mikroorganisme ini membutuhkan nutrisi yang sesuai untuk pertumbuhan dan perkembangbiakannya. Unsur-unsur dasar yang dibutuhkan adalah karbon, hidrogen, oksigen, fosfor, zat besi dan magnesium. Unsur karbon banyak diperoleh dari gula, sumber nitrogen didapatkan dari amonia, asam amino, peptida, pepton, nitrat atau urea bergantung pada jenis khamir. Fosfor merupakan unsur penting dalam kehidupan khamir terutama untuk pembentukan alkohol dari gula (Ruriani, 2010).

Khamir laut dapat menghasilkan bermacam-macam enzim ekstraselular seperti amilase, protease alkalin, protease asam, fitase, lipase, inulinase, dan toksin pembunuh (Chi *et al.*, 2009). Khamir laut juga dapat memproduksi protease alkalin, seperti *Candida lipolytica*, *Yarrowia lipolytica*, dan *Aureobasidium pullulans*. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Chi *et al.*, (2007), yang mengisolasi khamir laut *Aureobasidium pullulans* yang dapat menghasilkan protease dengan aktivitas dan konsentrasi protein masing-masing sebesar 7,2 U/mL, dan 623,1 U/mL. Selain itu, protease tersebut memiliki aktivitas optimum pada pH 9 dan suhu 50°C.

## 2.2 Ikan Peperek (*Leiognathus sp.*)

Ikan peperek termasuk ikan karnivora dengan panjang tubuh tidak lebih dari 15 cm; ikan ini badannya tinggi, pipih tegak dengan moncong mengarah kebawah, berlendir banyak pada kulitnya; ikan peperek mempunyai gigi bertulang yang mengelilingi kepala (Kottelat *et al.*, 1993). Gambar ikan peperek dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Ikan peperek (*Leiognathus sp.*)

Menurut Anonimous (2012), klasifikasi ikan peperek (*Leiognathus sp.*), adalah sebagai berikut :

Kingdom	: <u>Animalia</u>
Phylum	: <u>Chordata</u>
Subphylum	: <u>Vertebrata</u>
Superclass	: <u>Osteichthyes</u>
Class	: <u>Actinopterygii</u>
Subclass	: <u>Neopterygii</u>
Infraclass	: <u>Teleostei</u>
Superorder	: <u>Acanthopterygii</u>
Order	: <u>Perciformes</u>
Suborder	: <u>Percoidei</u>
Family	: <u>Leiognathidae</u>
Genus	: <u>Leiognathus</u>
Species	: <u>Leiognathus sp.</u>

Ikan peperek tergolong ikan yang bernilai ekonomis rendah, akan tetapi memiliki kandungan gizi yang cukup tinggi. Kandungan gizi tiap 100 gram daging ikan peperek terdiri dari energi, protein, lemak, karbohidrat, air, fosfat, besi,



kalsium, vitamin A, B, dan C. menurut Sediaoetama (2006) dapat dilihat pada

Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi kimia ikan peperek per 100 gram

Komposisi Kimia	Nilai
Energi	175 kal
Protein	21,3 g
Lemak	4,5 g
Karbohidrat	0
Air	33 g
Fosfat	200 g
Besi	1 mg
Kalsium	120 mg
Vitamin A	2 IU
Vitamin B	0,5 mg
Vitamin C	0

Sumber : Sediaoetama (2006)

Ikan peperek merupakan hasil samping dari penangkapan ikan-ikan ekonomis penting. Menurut Bykov (1986) ikan ini termasuk ikan dengan nilai ekonomis rendah (ikan rucah). Ikan peperek sementara ini banyak dimanfaatkan sebagai bahan pembuatan tepung ikan dan ikan kering asin. Salah satu upaya untuk meningkatkan nilai ekonomisnya yakni dengan membuat produk kaya protein yaitu hidrolisat protein ikan.

### 2.3 Protease

Enzim merupakan polimer biologis yang berperan mengatalisis suatu reaksi kimia (Murray *et al* 2009), yang diperlukan untuk menunjang berbagai proses dalam industri pangan maupun non pangan. Sebagai biokatalis, enzim memiliki sifat-sifat yang unik, yaitu antara lain dapat aktif dalam jumlah yang sangat kecil dan aksi katalitiknya spesifik (Murni, dkk, 2011). Wiranadikusumah (1989) mengatakan bahwa enzim dapat digolongkan berdasarkan reaksi yang



dikatalisisnya yakni oksireduktase yang berperan dalam reaksi oksidasi-reduksi. Transferase yang berperan dalam reaksi pemindahan gugus tertentu. Hidrolase yang berperan dalam reaksi hidrolisis. Liase yang berperan mengkatalisis reaksi adisi atau pemecahan ikatan rangkap dua. Isomerase yang berperan mengkatalisis reaksi isomerasi. Ligase yang berperan mengkatalisis reaksi pembentukan ikatan dengan bantuan pemecahan ikatan dalam ATP.

Enzim pada umumnya dikelompokkan dalam dua tipe, yaitu enzim ekstraseluler (berfungsi di luar sel) dan enzim intraseluler (berfungsi di dalam sel). Sebagian besar enzim mikroba yang dihasilkan secara komersial adalah enzim ekstraseluler (Sutandi, 2003). Fungsi utama enzim ekstraseluler adalah mengubah nutrien disekitarnya sebagai kebutuhan nutrisi untuk metabolisme yang akan dilakukan di dalam sel. Sedangkan enzim intraseluler merupakan enzim yang melakukan proses metabolisme di dalam sel itu sendiri.

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 sedangkan endopeptidase memecah protein dan ikatan peptida dari dalam (Muchtadi, dkk, 1992).

Protease dapat diisolasi dari tumbuhan (papain dan bromelin), hewan (tripsin, kimotripsin, pepsin, dan renin), mikroorganisme seperti bakteri, kapang, virus, dan cacing parasitik (Balqis, 2007). Dari ketiga sumber tersebut, protease yang diisolasi dari mikroorganisme adalah yang lebih menguntungkan karena dapat dihasilkan dalam jumlah yang cukup besar dengan waktu pertumbuhan yang singkat melalui pengkonsidian pertumbuhannya, dan rekayasa genetik, serta hanya menghabiskan sedikit biaya (Kosim dan Putra, 2010). Salah satu contohnya adalah protease ekstraseluler yang dihasilkan dari khamir laut (Chi et

*al.*, 2009). Protease ekstraselular adalah enzim yang dapat menghidrolisis protein menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana seperti peptida rantai pendek dan asam amino (Naiola dan Widhyastuti, 2002).

Kusuma (2010) mengatakan bahwa berdasarkan jenis residu asam amino dalam sisi aktifnya, protease dapat dibedakan menjadi empat golongan, yaitu protease serin, protease tiol, protease logam, dan protease karboksil. Protease serin adalah protease yang memiliki sisi aktif pada residu serin dan umumnya merupakan endopeptidase. Aktivitas optimum enzim ini berlangsung pada pH 7,8. Protease tiol merupakan kelompok protease yang mempunyai residu sistein pada sisi katalitiknya dan merupakan endopeptidase. Protease logam (metaloenzim) merupakan protease yang memiliki ion logam pada sisi katalitiknya. Protease ini umumnya merupakan eksopeptidase yang bersifat netral. Protease karboksil disebut juga protease asam, karena mempunyai dua residu aspartat pada sisi katalitiknya. Protease karboksil merupakan endopeptidase dengan umumnya pH optimum 2,0-5,0.

Protease yang berasal dari mikroorganisme adalah proteinase. Mikroorganisme mengeluarkan proteinase pada media fermentasi selama pertumbuhannya, sehingga waktu pemanenan proteinase ekstraseluler yaitu selama fase logaritmik sedangkan enzim intraseluler pemanenan dilakukan setelah pertumbuhan maksimum terlewati yaitu saat lisis. Penggunaan protease didasari aktivitas proteinasenya (Muchtadi, dkk, 1992).

Protease adalah salah satu dari berbagai jenis enzim yang berperan penting dalam industri pangan maupun non pangan. Pemanfaatan enzim di pasar global masih didominasi oleh enzim-enzim proteolitik yang menguasai pangsa pasar sekitar 65 % (Uyar *et al.*, 2011). Pemanfaatan protease juga memberikan kontribusi yang besar dalam meningkatkan kualitas produk, menghasilkan senyawa baru, meningkatkan nilai tambah produk, dan yang lebih



penting lagi adalah berperan dalam hal peningkatan kualitas lingkungan (Pawiroharsono, 2008). Salah satu peran dari protease adalah menghidrolisis ikatan peptida pada protein (Nuraini, 2002), menjadi produk hidrolisat protein (Pakpahan, 2009).

#### **2.4 Hidrolisat Protein Ikan**

Hidrolisat protein didefinisikan sebagai protein yang mengalami degradasi baik secara hidrolitik, fermentasi dan enzimatik dengan hasil akhir berupa senyawa protein yang lebih sederhana (Girindra, 1993). Hidrolisis protein secara enzimatik lebih disukai dibanding secara kimia, karena dapat berlangsung pada kondisi suhu yang relatif rendah, tidak mengakibatkan rasemisasi asam amino, tidak terbentuk lisinoalanin yang beracun, mengandung peptida-peptida rantai pendek dengan komposisi asam amino tertentu dan berat molekul tertentu, sehingga sangat cocok digunakan sebagai campuran untuk formula nutrisi tertentu (Ekantari, dkk, 2005).

Pembuatan hidrolisat protein dapat menggunakan berbagai macam bahan baku sebagai sumber protein yang akan dihidrolisis, salah satunya ikan yang dikenal dengan hidrolisat protein ikan. Hidrolisat protein ikan (HPI) merupakan produk cairan yang dibuat dari ikan dengan penambahan enzim proteolitik untuk mempercepat hidrolisis dalam kondisi terkontrol dengan hasil akhir berupa campuran komponen protein. HPI merupakan pengembangan dari proses pembuatan konsentrat protein ikan, dimana pada umumnya proses ini menghasilkan produk yang aplikasinya hanya terbatas pada pakan ternak, sehingga proses pembuatan HPI diharapkan dapat memperbaiki sifat fungsional dari konsentrat protein ikan untuk dimanfaatkan sebagai produk pangan (Koesoemawardi, 2009).



Daging ikan digunakan karena memiliki kandungan nutrisi yang relatif lebih tinggi bila dibandingkan daging sapi dan mamalia lainnya (Mackie, 1994).

Perbandingan antara daging ikan dan daging sapi dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Perbandingan Daging Ikan Dan Daging Sapi setiap 100 gr

Komponen Perbandingan	Daging Ikan	Daging Sapi
Kandungan Protein	21,3 gr <sup>a</sup>	18,8 gr <sup>b</sup>
Lemak	4,5 gr <sup>a</sup>	14,0 gr <sup>b</sup>
Daging dan Otot <sup>c</sup>	Berserat namun lebih halus dan lebih pendek ukurannya	Berserat namun lebih kasar dan panjang ukurannya

Sumber : <sup>a</sup>. Sediaoetama (2006); <sup>b</sup>. Hasbullah (2005); <sup>c</sup>. Mackie (1994)

Tabel 2 menunjukkan perbedaan yang jelas antara daging ikan dan sapi, dimana apabila memiliki kandungan protein tinggi, maka asam-asam amino yang menyusun protein pun lebih banyak. Kemudian apabila kalori yang dimiliki lebih tinggi, maka akan menghasilkan hidrolisat dengan kandungan lemak tinggi, sehingga akan memperpendek masa simpan (Pigot and Tucker, 1990). Yuanita (2006) mengatakan bahwa kandungan lemak yang tinggi pada suatu bahan akan memudahkan terjadinya oksidasi lemak yang mengakibatkan terbentuknya asam lemak rantai pendek, senyawa aldehid atau keton, sehingga menimbulkan ketengikan yang membuat suatu bahan memiliki masa simpan yang pendek. Selain itu, apabila serat yang dimiliki lebih halus dan pendek ukurannya, maka akan memudahkan proses hidrolisis protein ikan (Handayani, dkk, 2007).

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 berlebih menyebabkan jumlah peptida dan asam

amino menurun dan jumlah padatan tidak fungsional meningkat (Piggot and Tucker, 1990). Asam amino yang dapat dihasilkan oleh protein yang terhidrolisis secara sempurna adalah sebanyak 18 sampai 20 jenis asam amino (Ariyani, 2003). Hal lain yang berpengaruh adalah jenis katalis yang digunakan. Semakin cocok enzim yang akan menghidrolisis protein suatu bahan, maka semakin baik pula produk hidrolisat yang akan terbentuk. Enzim yang digunakan dalam mengkatalis reaksi-reaksi hidrolisis protein yakni enzim proteolitik atau protease (Hidayat, 2005), karena enzim ini dapat menghidrolisis ikatan peptida pada protein (Nuraini, 2002).

## 2.5 Isolasi dan Pemurnian Protease

Isolasi adalah tindakan memisahkan mikroba yang berasal dari lingkungan aslinya dan menumbuhkannya sebagai biakan murni di dalam media buatan (Ernawati, 2010). Isolasi dan pemurnian enzim dilakukan untuk memisahkan protein enzim tertentu dari ekstrak kasar yang mengandung banyak unsur lain (Aulanni'am, 2005). Isolasi enzim dari hewan, tumbuhan dan mikroorganisme dapat dilakukan dengan berbagai cara antara lain, ekstraksi, presipitasi, sentrifugasi, dan kromatografi (Lehninger, 1997).

Isolasi enzim bertujuan memekatkan enzim hasil fermentasi. Proses ekstraksi enzim dapat dijalankan melalui empat langkah proses, yaitu : (1) menghilangkan bahan-bahan terlarut dari bahan baku, (2) mengisolasi produk dari larutan encer yang dihasilkan untuk menghasilkan lebih larutan pekat, (3) memurnikan produk, menghilangkan spesies lain yang mungkin mirip, dan (4) pemurnian akhir, yang disebut dengan *polishing*. Proses pemekatan enzim dapat dilakukan dengan metode pengendapan protein melalui penambahan garam mineral. Metode ini merupakan bagian dari proses isolasi dengan metode ekstraksi. Metode ekstraksi digunakan untuk memisahkan enzim (protein) yang



terkandung dalam larutan dengan menggunakan garam mineral, sehingga enzim yang merupakan fraksi berat akan terendapkan di bawah (Murni, dkk, 2011 ).

Isolasi dari enzim ekstraselular lebih mudah dikarenakan tidak diperlukan lagi proses pemecahan dinding sel sehingga ekstraksi dan isolasinya relatif lebih mudah. Sedangkan untuk enzim intraselular pada umumnya bersifat lebih rumit dibandingkan enzim ekstraseluler sehingga penanganannya harus lebih berhati-hati (Supriyanto, dkk, 2009). Protease dihasilkan oleh mikroorganisme dan merupakan enzim ekstraseluler yang dapat diisolasi secara sentrifugasi pada media pertumbuhan jamur dan bakteri (Schomburg and Salzman, 1991).

Pemurnian enzim dapat dilakukan berdasarkan sifat-sifat enzim sebagai protein yang berbeda dalam hal kelarutan, muatan, dan ukuran atau berat molekulnya (Lehninger, 1988). Beberapa metode pemurnian enzim adalah pengendapan, filtrasi membran, kromatografi adsorpsi, kromatografi afinitas, dan filtrasi gel (McKee and McKee, 2003).

Pemurnian protein pada umumnya diawali dengan fraksinasi, salah satunya dilakukan presipitasi dengan garam ammonium sulfat (Wirajana dan Puspaningsih, 2011). Fraksinasi merupakan salah satu cara pemurnian protein melalui proses pengendapan. Fraksinasi amonium sulfat bertingkat dilakukan untuk memisahkan protein enzim dari protein yang lain, sehingga diperoleh tingkat kemurnian protein pada setiap fraksi. Penambahan garam ammonium sulfat akan menurunkan kelarutan protein karena terjadi kompetisi antara ion garam yang ditambahkan dengan protein yang terlarut sehingga terjadi efek *salting out* (Rejeki, dkk, 2009).

Efek *salting out* ditandai oleh kenaikan konsentrasi amonium sulfat menyebabkan enzim keluar dari larutan membentuk endapan (Murni dkk, 2011). Pengendapan ini terjadi karena garam yang tersolvasi cenderung mengurangi molekul air pada bagian permukaan hidrofob protein, selanjutnya berinteraksi



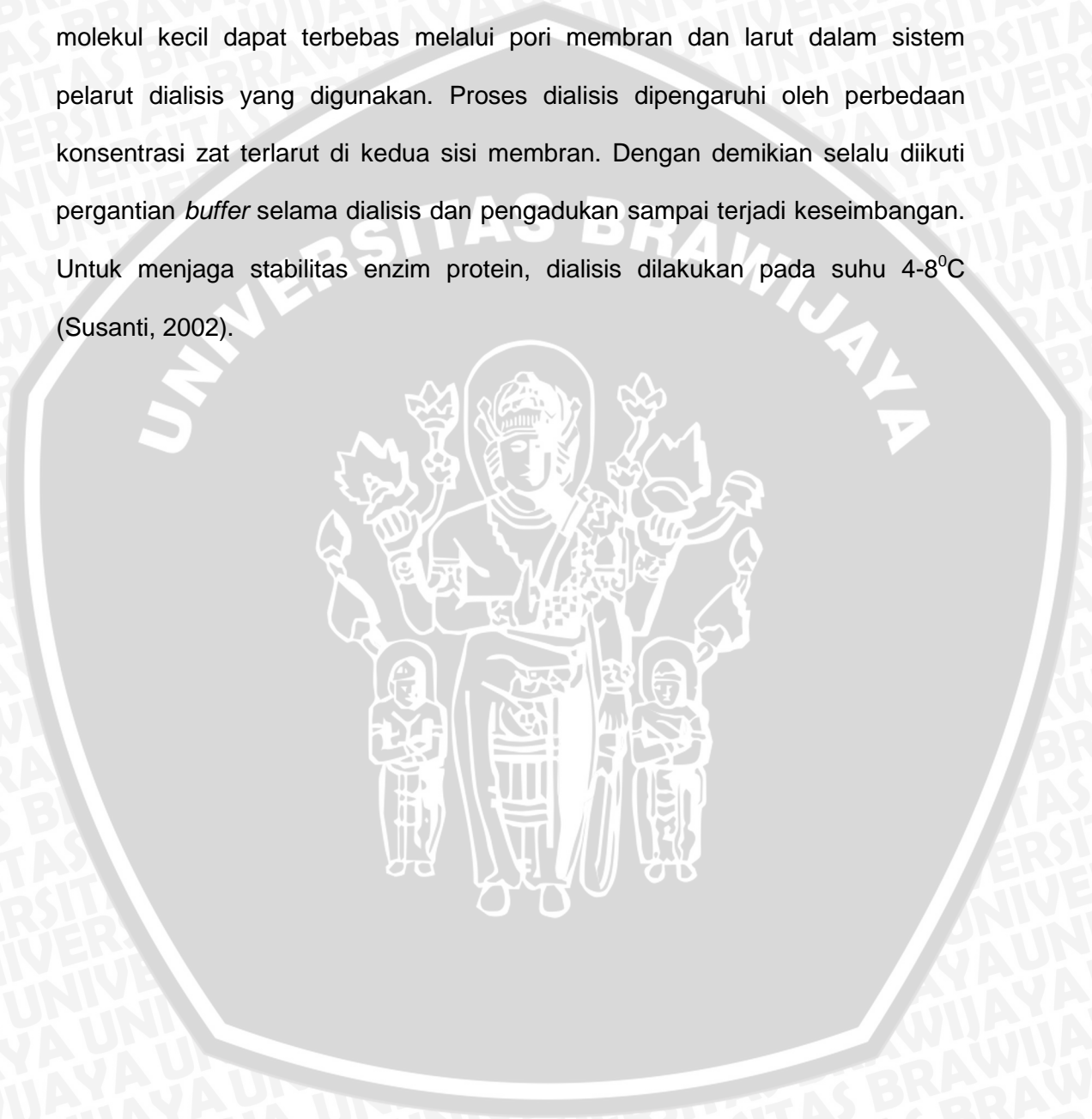
satu sama lainnya membentuk agregat. Molekul protein dengan berat molekul besar memerlukan konsentrasi garam yang kecil untuk membentuk endapan dan akan mengendap lebih dulu (Susanti, 2002).

Amonium sulfat merupakan garam mineral yang paling umum digunakan dalam proses pengendapan enzim, karena solubilitasnya di dalam air amat tinggi, tidak mengandung zat-zat yang toksik terhadap kebanyakan enzim, harganya relatif murah, dan dalam jumlah banyak dapat bertindak sebagai stabilisator enzim itu sendiri (Murni, dkk, 2011). Seringkali penggumpalan dengan cara *salting out* dilakukan pada suhu rendah ( $4^{\circ}\text{C}$ ). Enzim yang telah menggumpal dipisahkan dari supernatan dengan sentrifus. Enzim ini masih belum murni dan tercampur dengan protein lainnya walaupun sudah bebas dari komponen non protein (Suhartono, 1989).

Endapan dari enzim yang masih tercampur dengan protein maupun sisa-sisa garam amonium sulfat dan molekul-molekul kecil lainnya selanjutnya dimurnikan kembali dengan cara sentrifugasi melalui proses dialisis menggunakan tabung selofan yang bersifat semipermeabel (Susanti, 2002). Hal ini dilakukan untuk memurnikan enzim dari garam amonium sulfat yang masih tersisa dari hasil fraksinasi (Rejeki, dkk, 2009). Menurut Judoamidjojo, dkk (1992) pemisahan partikel dari larutan pada metode sentrifugasi termasuk pemisahan sel-sel dari medium biakan atau penyingkiran hancuran sel serta pengumpulan endapan. Rahayu (1991) menjelaskan bahwa sentrifugasi dilakukan pada kecepatan dan gaya berat tertentu sehingga sel-sel mikroorganisme mengendap dan supernatan merupakan cairan yang berisi enzim. Isolasi enzim dilakukan pada suhu rendah dan campuran ditambah larutan penyangga (*buffer*) untuk mempertahankan kestabilan enzim. Enzim yang diharapkan nantinya akan berada pada lapisan air (supernatan). Baehaki dkk (2008) mengatakan bahwa

sentrifugasi dilakukan pada suhu rendah untuk mencegah terjadinya kerusakan struktur enzim.

Proses dialisis berlangsung berdasarkan sifat semipermeabel membran, dimana molekul besar protein akan bertahan dalam membran sedangkan molekul kecil dapat terbebas melalui pori membran dan larut dalam sistem pelarut dialisis yang digunakan. Proses dialisis dipengaruhi oleh perbedaan konsentrasi zat terlarut di kedua sisi membran. Dengan demikian selalu diikuti pergantian *buffer* selama dialisis dan pengadukan sampai terjadi keseimbangan. Untuk menjaga stabilitas enzim protein, dialisis dilakukan pada suhu 4-8°C (Susanti, 2002).



### 3. MATERI DAN METODE PENELITIAN

#### 3.1 Materi Penelitian

##### 3.1.1 Bahan dan Alat Penelitian

###### 3.1.1.1 Bahan Penelitian

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah biakan khamir laut dan ikan peperek (*Leiognathus sp.*).

- Bahan-bahan kultur khamir laut adalah air laut murni, gula pasir, pupuk daun (hortigro), stok khamir laut, dan akuades. Bahan-bahan yang digunakan dalam tahap pemurnian ekstraselular khamir laut adalah biakan khamir laut yang baru, kasein, TCA (*Tri Cloroacetic Acid*), larutan penyangga glisin-NaOH, amonium sulfat, *buffer phosphate*,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , EDTA, benang, dan kantong selofan.
- Bahan-bahan karakterisasi ekstraselular khamir laut adalah supernatan ekstraselular khamir laut, *phosphate buffer saline* (PBS), tambaga (II) sulfat ( $\text{CuSO}_4$ ), kalium natrium tartrat ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ ), natrium hidroksida (NaOH), kalium iodida (KI), *Bovine Serum Albumin* (BSA), reagen *folin-phenol ciocalteau*, larutan penyangga glisin-NaOH, kasein, TCA (*Tri Cloroacetic Acid*), tirosin, alkalin  $\text{CuSO}_4$ , dan akuades steril.
- Bahan-bahan untuk karakterisasi aktivitas hidrolisis ekstraselular khamir laut yang dipanen pada fase log terhadap protein ikan peperek (*Leiognathus sp.*) yang meliputi analisa derajat hidrolisis, berat molekul, dan profil asam amino, adalah sebagai berikut : Bahan-bahan untuk analisa derajat hidrolisis adalah *phosphate buffer saline* (PBS), kertas pH, kalium natrium tartrat ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ ), larutan *Nessler*, dan tablet kjeldahl. Bahan-bahan untuk analisa berat molekul adalah *Acrylamide* 30%, Tris-Cl 1,5 M pH 8,8, akuades, *ammonium persulfate* (APS), *sodium dodecyl sulphate* (SDS), *tetrametiletildiamin* (TEMED), *reducing sample buffer* (RSB), *commasie blue*, metanol, asam asetat glasial, dan



akuades. Bahan-bahan untuk analisa profil asam amino adalah kertas saring *whatman*, asam borat, akuabides, larutan *o-phthaldehyde* (OPA), metanol, dan merkaptoetanol.

### 3.1.1.2 Alat Penelitian

- Alat-alat kultur khamir laut adalah botol kaca, gelas ukur 50 mL, erlenmeyer 250 mL, tabung reaksi, rak tabung reaksi, spatula, pipet volum, bola hisap, timbangan digital, selang, aerator, kompor gas, panci perebusan, gunting, sendok plastik, *crushable tang*, bunsen, botol spray, dan mikroskop. Alat-alat pemurnian ekstraselular khamir laut adalah timbangan analitik, spatula, kuvet, sentrifus suhu rendah, waterbath, erlenmeyer (500 mL dan 1000 mL), pH-meter, *magnetic stirrer*, *stir bar*, lemari pendingin 4°C, *beaker glass* 250 mL, *hot plate*, pinset, cawan petri, dan penjepit selofan.

- Alat-alat karakterisasi ekstraselular khamir laut adalah timbangan analitik, spatula, mikropipet, *blue tip*, *yellow tip*, tabung reaksi, rak tabung reaksi, inkubator, sentrifus suhu rendah, *eppendorf*, *falcon*, vorteks, pH meter, dan spektrofotometer.

- Alat-alat karakterisasi aktivitas hidrolisis ekstraselular khamir laut yang dipanen pada fase log terhadap protein ikan peperek (*Leiognathus* sp.) yang meliputi analisa derajat hidrolisis, berat molekul, dan profil asam amino, adalah sebagai berikut : Bahan-bahan untuk analisa derajat hidrolisis adalah blender, waterbath, sentrifus suhu ruang, *beaker glass* 250 mL, *falcon*, mikropipet, *blue tip*, vorteks, *waterbath shaker*, labu kjeldahl, alat destruksi, dan spektrofotometer.

Bahan-bahan untuk analisa berat molekul adalah *hot plate*, *eppendorf*, mikropipet, *yellow tip*, rak tabung reaksi, vorteks, *power supply*, dan *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS PAGE). Alat-alat untuk analisa asam amino adalah pipet volum, bola hisap, mikropipet, blender, *stirrer*,

*beaker glass*, timbangan digital, sendok, *waterbath*, oven, *sentrifuge room* *temperarure*, *falcon*, vorteks, dan *High Performance Liquid Chromatography*.

### 3.2 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksploratif. Penelitian eksploratif adalah jenis penelitian yang berusaha mencari ide-ide atau hubungan-hubungan yang baru (Umar, 1999). Metode ini mengarahkan studi ke suatu sasaran penelitian dan bersifat mengkomparasikan antara metode riset kualitatif dan kuantitatif. Kuncoro (2003) mengatakan bahwa tujuan dari penelitian eksploratif adalah untuk mengembangkan pengetahuan atau dugaan yang sifatnya masih baru dan untuk memberikan arah bagi penelitian selanjutnya.

### 3.3 Prosedur Penelitian

Penelitian ini meliputi dua tahap, pertama adalah tahap karakterisasi ekstraselular khamir laut. Pada tahapan ini, khamir laut dibiakkan terlebih dahulu dan dipanen pada masa pertumbuhan optimumnya. Selanjutnya khamir laut diisolasi untuk memperoleh ekstrak kasarnya, kemudian dimurnikan kembali dengan cara dialisis untuk menghilangkan senyawa-senyawa pengotor yang ada dalam enzim. Setelah itu, dilakukan karakterisasi ekstraselular khamir laut, yang meliputi : konsentrasi protein, aktivitas, dan kinetiknya.

Tahap kedua dari penelitian ini adalah karakterisasi aktivitas hidrolisis ekstraselular khamir laut yang dipanen pada fase log terhadap kandungan protein ikan peperek (*Leiognathus* sp.). Pada tahapan ini, dianalisa kemampuan ekstraselular khamir laut dalam menghidrolisis protein ikan peperek dari segi waktu, suhu, pH, dan konsentrasi substrat, kemudian dari masing-masing perlakuan tersebut diambil kondisi optimasinya berdasarkan derajat hidrolisis.



Selanjutnya, dilakukan analisa berat molekul dan profil asam amino dari hidrolisat protein ikan (HPI) peperek (*Leiognathus* sp.).

### 3.3.1 Kultur dan Pemurnian Ekstraselular Khamir Laut

#### 3.3.1.1 Kultur Khamir Laut

Kultur dari khamir laut menggunakan metode Syafii dan Sukoso (2011). Prinsip dari kultur ini adalah perbanyakkan khamir laut yang dapat memproduksi ekstraselular khamir laut, yang pada proses pertumbuhannya menggunakan media air laut dengan memanfaatkan gula dan pupuk daun sebagai sumber nutrisi untuk mempercepat pertumbuhannya. Menurut Kosaric *et al* (1983), unsur-unsur dasar yang dibutuhkan khamir untuk pertumbuhan dan perkembangbiakannya adalah karbon, hidrogen, oksigen, fosfor, zat besi dan magnesium. Unsur karbon banyak diperoleh dari gula, sumber nitrogen didapatkan dari amonia, asam amino, peptida, pepton, nitrat atau urea bergantung pada jenis khamir.

#### A. Preparasi Bahan

- Air laut 8 Liter.
- Gula pasir 0,5% (b/v), dan pupuk daun 0,2% (b/v) dalam 1 L air laut :

$$\% \frac{b}{v} = \frac{\text{jumlah zat terlarut}}{\text{jumlah pelarut}} \times 100\%$$

$$\text{Gula pasir 0,5\%} : 0,5\% = \frac{\text{jumlah gula terlarut}}{1000} \times 100\%$$

$$\text{Jumlah gula terlarut} = 5 \text{ gr}$$

$$\text{Pupuk daun 0,2\%} : 0,2\% = \frac{\text{jumlah pupuk terlarut}}{1000} \times 100\%$$

$$\text{Jumlah pupuk terlarut} = 2 \text{ gr}$$

- Stok khamir laut 16 mL.



## B. Prosedur Kerja

- Air laut sebanyak 2 L dipanaskan hingga mendidih dan didiamkan hingga dingin.
- Gula pasir sebanyak 10 gr, pupuk daun sebanyak 4 gr, dan stok khamir laut sebanyak 2 mL dimasukkan kedalam 8 L air laut dan dihomogenkan (untuk 1 botol kaca : gula pasir sebanyak 5 gr, pupuk daun sebanyak 2 gr, dan stok khamir laut sebanyak 2 mL ditambahkan kedalam 1 L air laut).
- Diaerasi selama 3 hari.
- Terdapat endapan khamir laut sebagai stok yang baru.

### 3.3.1.2 Penentuan Fase Log Khamir Laut

Penentuan fase log khamir laut selama masa kulturnya dilakukan melalui pengamatan mikroskop dan analisa turbiditas khamir laut.

#### a. Pengamatan Mikroskop

- Kultur khamir laut selama aerasi diambil sebanyak 0,1 mL menggunakan pipet tetes kemudian diletakkan pada *object glass* dan ditutup dengan *cover glass*.
- Diamati pertumbuhan sel yang terjadi.
- Pengamatan mikroskop dilakukan setiap 24 jam sekali.
- Pertumbuhan sel yang sangat tinggi menandakan fase log dari khamir laut.

#### b. Analisa Turbiditas (kekeruhan) Khamir Laut

- Kultur khamir laut yang diaerasi
- Pembuatan media pengenceran : air laut sebanyak 1 Liter disterilisasi dengan direbus selanjutnya dibiarkan hingga dingin kemudian diambil sebanyak 50 mL dan dimasukkan dalam erlenmeyer. Setelah itu ditambahkan gula pasir sebanyak 0,25% (b/v) dan pupuk daun sebanyak

0,1% (b/v) ke dalam erlenmeyer dan dihomogenkan. Perhitungan banyaknya gula dan pupuk yang ditambahkan adalah sebagai berikut :

$$\begin{aligned}\text{Gula pasir } 0,5 \% &= \frac{\text{banyaknya gula pasir yang terlarut}}{\text{volume media pengenceran}} \times 100 \\ &= \frac{\text{banyaknya gula pasir yang terlarut}}{50 \text{ mL}} \times 100\% \\ &= 0,25 \text{ gram}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Pupuk daun } 0,2\% &= \frac{\text{banyaknya pupuk daun yang terlarut}}{\text{volume media pengenceran}} \times 100\% \\ &= \frac{\text{banyaknya pupuk daun yang terlarut}}{50 \text{ mL}} \times 100\% \\ &= 0,1 \text{ gram.}\end{aligned}$$

- Campuran dimasukkan dalam empat tabung reaksi, masing-masing tabung reaksi diisi sebanyak 9 mL. Selanjutnya dilakukan pengenceran bertingkat dari  $10^{-1}$ - $10^{-4}$ , setiap selesai pengenceran divorteks.
- Dibaca absorbansi campuran pada turbidimeter untuk melihat tingkat kekeruhannya. Semakin tinggi turbiditas atau kekeruhan khamir laut, maka pertumbuhan khamir laut berada dalam fase log.

### 3.3.1.2 Ekstraksi Khamir Laut

Ekstraksi khamir laut menggunakan metode sentrifugasi (Ping *et al.*, 2006). Prinsip utama sentrifugasi adalah memisahkan substansi berdasarkan berat jenis molekul dengan cara memberikan gaya sentrifugal sehingga substansi yang lebih berat akan berada di dasar, sedangkan substansi yang lebih ringan akan terletak di atas (Faatih, 2009).

#### A. Preparasi Bahan

- Stok khamir laut sebanyak 100 mL dari hasil kultur.

- TCA 10% (b/v) sebanyak 400 mL : TCA sebanyak 40 gr dilarutkan dalam 400 mL akuades.

$$\text{TCA 10\%} : 10\% = \frac{\text{Jumlah TCA yang terlarut}}{400 \text{ mL}} \times 100\%$$

$$\text{Jumlah TCA terlarut} = 40 \text{ gr}$$

- Glisin 0,05 M : glisin sebanyak 0,375 gr dilarutkan dalam 100 mL akuades.

$$M = \frac{n}{V} \rightarrow M = \frac{\text{gr}}{\text{Mr}} \times \frac{1}{V}$$

$$\text{Glisin 0,05 M dalam 100 mL akuades} = M \times \text{Mr} \times V$$

$$= 0,05 \text{ M} \times 75 \times 0,1 \text{ L}$$

$$= 0,375 \text{ gr.}$$

- NaOH 0,05 M : NaOH sebanyak 0,2 gr dilarutkan dalam 100 mL akuades.

$$\text{NaOH 0,05 M dalam 100 mL akuades} = M \times \text{Mr} \times V$$

$$= 0,05 \text{ M} \times 40 \times 0,1 \text{ L}$$

$$= 0,2 \text{ gr.}$$

- Bufer glisin-NaOH dihomogenkan pada *magnetic stirrer* dan diatur pH-nya pada pH 9.

- Kasein 0,5% (b/v) sebanyak 200 mL : kasein sebanyak 1 gr dilarutkan dalam 200 mL bufer glisin NaOH 0,5 M dengan pH 9.

$$\text{Kasein 0,5\%} : 0,5\% = \frac{\text{Jumlah kasein yang terlarut}}{200 \text{ mL}} \times 100\%$$

$$\text{Jumlah kasein terlarut} = 1 \text{ gr}$$

#### B. Prosedur Kerja

- Khamir laut sebanyak 100 mL disentrifugasi dengan kecepatan 5.000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit (diambil supernatannya).
- Supernatan sebanyak 100 mL ditambahkan pada kasein 0,5% (b/v) dalam 200 mL glisin NaOH 0,05 M pH 9.
- Larutan diinkubasi dalam waterbath pada suhu 45°C selama 30 menit.



- Larutan ditambahkan dalam 400 mL TCA 10% (b/v).
- Larutan disentrifus pada suhu 4°C, dengan kecepatan 10000 rpm selama 10 menit (diambil supernatannya).
- Supernatan yang diperoleh merupakan ekstrak kasar khamir laut.

### 3.3.1.3 Pemurnian Ekstraselular Khamir Laut

#### 1. Pengendapan dengan Amonium Sulfat ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

Prinsip pengendapan dengan garam amonium sulfat adalah *salting out*, dimana amonium sulfat mampu mengikat molekul air yang mengelilingi molekul protein sehingga menyebabkan protein mengendap. Tujuan pengendapan adalah untuk memekatkan enzim dan pemisahan komponen protein berdasarkan sifat ioniknya (Yuanita dkk 2010).

##### A. Preparasi Bahan

- Supernatan ekstrak kasar khamir laut sebanyak 100 mL.
- Amonium sulfat 40% (b/v) dalam 100 mL supernatan.

$$\text{Amonium sulfat 40\% : 40\%} = \frac{\text{Jumlah amonium sulfat yang terlarut}}{100 \text{ mL}} \times 100\%$$

$$\text{Jumlah amonium sulfat terlarut} = 40 \text{ gr.}$$

##### B. Prosedur Kerja

- Supernatan sebanyak 100 mL.
- Amonium sulfat sebanyak 40 gr dilarutkan dalam 100 mL supernatan.
- Dihomogenkan dengan *magnetic stirrer* pada suhu 4°C selama 30 menit.
- Larutan disentrifus pada suhu 4°C dengan kecepatan 10000 rpm selama 10 menit.
- Terdapat endapan (pelet) berwarna cokelat.

## 2. Dialisis

Prinsip dari dialisis ialah aplikasi preparasi enzim ke dalam kantong dialisis yang terbuat dari membran semi-permiabel yang memungkinkan molekul berukuran kecil untuk bermigrasi (Dyannar, 2011). Selain itu, pada awal dialisis, konsentrasi garam didalam selofan lebih tinggi daripada diluar selofan yang menyebabkan bufer masuk kedalamnya. Selanjutnya, garam akan keluar dari dalam selofan dengan cara difusi, hingga tercapai kondisi kesetimbangan dimana konsentrasi garam didalam dan diluar kantong sama (Puspita, 2007).

### A. Preparasi Bahan

- $\text{Na}_2\text{CO}_3$  5% (b/v) :  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  sebanyak 5 gr dilarutkan dalam 100 mL akuades.

$$\text{Na}_2\text{CO}_3 \text{ 5\%} : 5\% = \frac{\text{Jumlah Na}_2\text{CO}_3 \text{ yang terlarut}}{100 \text{ mL}} \times 100\%$$

$$\text{Jumlah Na}_2\text{CO}_3 \text{ terlarut} = 5 \text{ gr.}$$

- EDTA 50 mM pH 8 : EDTA sebanyak 1,861 gr dilarutkan dalam 100 mL akuades.
- Akuades steril sebanyak 100 mL.
- Preparasi selofan.
  - a) Selofan dipotong dengan panjang 10 cm.
  - b)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  5% (b/v) dalam 100 mL akuades, dididihkan diatas *hot plate* kemudian dimasukkan selofan dan dibiarkan selama 15 menit, setelah itu dicuci dengan akuades.
  - c) EDTA sebanyak 1,861 gr dalam 100 mL akuades, dididihkan diatas *hot plate* kemudian dimasukkan selofan dan dibiarkan selama 15 menit, setelah itu dicuci dengan akuades.

Puspita (2007) mengatakan bahwa tujuan perebusan selofan menggunakan larutan sodium karbonat dan EDTA adalah untuk menghilangkan protein yang mungkin menempel pada kantong serta

untuk menghindari kontaminasi dari bahan kimia selama proses pembuatan selofan.

d) Akuades steril sebanyak 100 mL, dididihkan diatas *hot plate* kemudian dimasukkan selofan dan dibiarkan selama 15 menit, setelah itu dicuci kembali dengan akuades steril.

e) Selofan siap untuk digunakan.

- Pelet hasil pengendapan dengan amonium sulfat 40% (b/v).
- *Phosphate buffer* 0,1 M pH 8 sebanyak 50 mL.
- *Phosphate buffer* 0,05 M pH 8 sebanyak 1 Liter.

#### B. Prosedur Kerja

- Pelet hasil pengendapan dengan amonium sulfat ditambahkan *phosphate buffer* 0,1 M pH 8 sebanyak 20 mL.
- Dimasukkan dalam lima selofan masing-masing sebanyak 4 mL.
- Tiap ujung selofan dirapatkan kemudian diberi penjepit pada tiap sisinya dan diikat dengan tali hingga rapat. Tujuannya adalah agar penjepit tidak terbuka saat proses dialisis berlangsung.
- Selofan yang sudah diisi campuran pelet dan *phosphate buffer* 0,1 M pH 8, dimasukkan dalam *beaker glass* yang telah diisi *phosphate buffer* 0,05 M pH 8 sebanyak 1 Liter.
- Campuran didialisis pada suhu 4<sup>0</sup>C selama semalam.
- Cairan dalam kantong selofan diambil dan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm pada suhu 4<sup>0</sup>C selama 15 menit (diambil supernatannya).
- Supernatan yang diperoleh merupakan ekstraselular khamir laut.



### 3.3.2 Karakterisasi Ekstraselular Khamir Laut

#### 3.3.2.1 Penentuan Konsentrasi Protein

Penentuan konsentrasi protein ekstraselular khamir laut menggunakan metode Lowry (1951). Prinsip kerja metode Lowry adalah reduksi  $\text{Cu}^{2+}$  oleh tirosin, triptofan, dan sistein yang terdapat dalam protein. Ion  $\text{Cu}^+$  bersama dengan fosfotungstat dan fosfomolibdat akan membentuk warna biru, sehingga dapat menyerap cahaya (Purwoko dan Handajani, 2007). Pasaribu (2012) mengatakan bahwa metode Lowry mengkombinasikan pereaksi biuret dengan pereaksi *folin-ciocalteau phenol*. Reaksi ini akan menghasilkan warna kebiruan yang dapat dibaca pada panjang gelombang antara 500-750 nm sesuai sensitivitas yang dibutuhkan. Panjang gelombang 500 nm digunakan untuk menentukan konsentrasi protein tinggi sedangkan panjang gelombang sekitar 750 nm digunakan untuk konsentrasi protein yang rendah. Kelebihan metode Lowry daripada metode biuret yakni metode ini lebih sensitif digunakan pada pengukuran konsentrasi protein yang rendah.

##### A. Preparasi Bahan

- Ekstraselular khamir laut sebanyak 200  $\mu\text{L}$  masing-masing untuk enam tabung reaksi.
- *Bovine Serum Albumin* (BSA) sebanyak 0,3 mg.
- *Phosphate Buffer Saline* (PBS) sebanyak 1 mL.
- Alkalin  $\text{CuSO}_4$  sebanyak 2 mL.
- Reagen *folin-phenol ciocalteau* sebanyak 2 mL.

##### B. Prosedur Kerja

- Larutan BSA dan PBS dimasukkan ke dalam masing-masing tabung reaksi yang telah diberi label. Setelah itu dihomogenkan menggunakan

vortek untuk membuat standar BSA. Pembuatan standar BSA dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Pembuatan standar BSA

BSA yang diambil ( $\mu\text{L}$ )	PBS ( $\mu\text{L}$ )	Konsentrasi Standar BSA
5	195	0,05
10	190	0,1
20	180	0,2
40	160	0,4
60	140	0,6
80	120	0,8

- Ekstraselular khamir laut sebanyak 200  $\mu\text{L}$  ditambahkan kedalam masing-masing tabung reaksi yang telah diisi larutan BSA kemudian dihomogenkan dengan vorteks.
- Alkalin  $\text{CuSO}_4$  sebanyak 2 mL ditambahkan ke dalam masing-masing tabung reaksi dan dihomogenkan dengan vorteks. Larutan ini merupakan reagen analitik yang bertujuan untuk mempertahankan warna dari sampel yang akan diukur absorbansinya.
- Campuran diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit.
- Reagen *folin-phenol ciocalteau* sebanyak 200  $\mu\text{L}$  ditambahkan ke dalam masing-masing tabung reaksi yang telah diisi dengan larutan BSA, ekstraselular khamir laut, dan alkalin  $\text{CuSO}_4$  dan divorteks.
- Campuran diinkubasi pada suhu  $37^\circ\text{C}$  selama 30 menit.
- Sampel dibaca absorbansinya pada spektrofotometer UV-VIS 1.700 dengan panjang gelombang 660 nm.

### C. Perhitungan Konsentrasi Protein

Untuk perhitungan konsentrasi protein dapat dihitung menggunakan persamaan regresi linier standar tirosin dengan *Microsoft Excel* 2007, dengan rumus sebagai berikut :

$$y = ax + b$$

Keterangan :  $y$  = absorbansi  
 $b$  = konsentrasi

### 3.3.2.2 Penentuan Aktivitas Ekstraselular Khamir Laut

Penentuan aktivitas ekstraselular khamir laut menggunakan metode Bergmeyer *et al.*, (1983), dengan kolorimetri menggunakan *Follin-phenol reagent*. Prinsip kerja metode Lowry adalah reduksi  $\text{Cu}^{2+}$  (reagen Lowry B) menjadi  $\text{Cu}^+$  oleh tirosin, triptofan, dan sistein yang terdapat dalam protein. Ion  $\text{Cu}^+$  bersama dengan fosfotungstat dan fosfomolibdat (reagen Lowry E) membentuk warna biru.

#### A. Preparasi Bahan

- Ekstraselular khamir laut sebanyak 200  $\mu\text{L}$ .
- Larutan PBS sebanyak 300  $\mu\text{L}$ .
- Kasein sebanyak 0,006 gram.
- Glisin dan NaOH masing-masing sebanyak 0,0075 gram.
- Tirosin dilarutkan dalam 200  $\mu\text{L}$  larutan glisin-NaOH sebagai standar.
- Akuades steril sebanyak 200  $\mu\text{L}$ .
- Larutan TCA 4% (b/v) dalam 1,5 mL akuades steril.

$$\begin{aligned} \text{TCA 4\%} &= \frac{\text{jumlah TCA terlarut}}{\text{volume pelarut}} \times 100\% \\ &= \frac{\text{jumlah TCA terlarut}}{1,5 \text{ mL}} \times 100\% \end{aligned}$$

$$\text{TCA terlarut} = 0,06 \text{ gram.}$$

- Reagen *follin-phenol ciocalteau* sebanyak 8 mL.

#### B. Prosedur Kerja

Prosedur kerja dari aktivitas ekstraselular khamir laut yang dipanen pada jam ke-48 dapat dilihat pada Tabel 4.



Tabel 4. Prosedur kerja penentuan aktivitas ekstraselular khamir laut

	Sampel	Standar	Blanko
Larutan kasein 0,5% dalam glisin-NaOH	400 $\mu$ L	400 $\mu$ L	400 $\mu$ L
Larutan PBS pH 7,4	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L
Ekstraselular khamir laut	200 $\mu$ L	-	-
Larutan standar tirosin dalam glisin-NaOH	-	200 $\mu$ L	-
Akuades steril	-	-	200 $\mu$ L
Inkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit			
Larutan TCA 4% dalam akuades	500 $\mu$ L	500 $\mu$ L	500 $\mu$ L
Inkubasi pada suhu ruang selama 30 menit			
Sentrifus pada suhu 4°C dengan kecepatan 10000 rpm selama 10 menit			
Supernatan	1 mL	1 mL	1 mL
Reagen <i>follin-phenol ciocalteau</i>	2 mL	2 mL	2 mL
Inkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit			
Absorbansi sampel dibaca pada spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 660 nm			

- Tabung reaksi sebanyak 3 buah diberi label sebagai sampel, standar, dan blanko.
- Larutan kasein 0,5% (b/v) dalam 400  $\mu$ L glisin-NaOH masing-masing ditambahkan dalam ketiga tabung reaksi.
- Larutan PBS (*Phosphate Buffer Saline*) pH 7,4 sebanyak 100  $\mu$ L ditambahkan pada ketiga tabung reaksi yang telah diisi larutan kasein 0,5% (b/v) kemudian divorteks.
- Ekstraselular khamir laut sebanyak 200  $\mu$ L dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang dilabeli sampel dan divorteks.
- Larutan standar tirosin dalam 200  $\mu$ L glisin-NaOH ditambahkan ke dalam tabung reaksi yang dilabeli standar dan divorteks.

- Akuades steril sebanyak 200  $\mu\text{L}$  ditambahkan ke dalam tabung reaksi yang dilabeli blanko dan divorteks.
- Ketiga tabung reaksi diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 30 menit.
- Larutan TCA (*Trichloroacetic Acid*) masing-masing sebanyak 500  $\mu\text{L}$  ditambahkan ke dalam ketiga tabung reaksi dan divorteks.
- Ketiga tabung reaksi diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit.
- Campuran disentrifus pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$  pada kecepatan 10000 rpm selama 10 menit dan diambil supernatannya.
- Supernatan sebanyak 1 mL dari masing-masing tabung reaksi ditambahkan reagen *follin-phenol ciocalteau* sebanyak 2 mL.
- Ketiga tabung reaksi diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 30 menit.
- Sampel dari setiap tabung reaksi dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 660 nm.

### C. Perhitungan Aktivitas Enzim

Nilai absorbansi sampel, standar, dan blanko yang diujikan pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 660 nm diaplikasikan dalam rumus berikut :

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

Keterangan : U = aktivitas ekstraselular khamir laut (U/mL)  
 abs. sampel = nilai serapan sampel  
 abs. standar = nilai serapan standar  
 abs. blanko = nilai serapan blanko  
 Fp = faktor pengenceran  
 t inkubasi = waktu selama inkubasi (menit)

Aktivitas spesifik enzim dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut :

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

Keterangan : AS = aktivitas spesifik ekstraselular khamir laut (U/mg)  
 U = aktivitas ekstraselular khamir laut  
 X = konsentrasi protein

### 3.3.2.3 Penentuan Kinetika Ekstraselular Khamir Laut

Penentuan kinetika ekstraselular khamir laut dapat dilakukan dengan mengukur nilai  $K_m$  dan  $V_{maks}$  berdasarkan parameter Michaelis-Menten (1912). Putra (2009) mengatakan bahwa  $K_m$  merupakan konsentrasi substrat dimana separuh dari lokasi aktifnya telah terisi, yaitu bila kecepatan reaksi enzim telah mencapai  $\frac{1}{2} V_{maks}$ . Sedangkan  $V_{maks}$  merupakan kondisi dimana kecepatan tidak dapat bertambah lagi dengan bertambahnya konsentrasi substrat.

#### A. Preparasi Bahan

- Ekstraselular khamir laut sebanyak.
- Ikan peperek beku di *thawing* terlebih dahulu kemudian direbus dalam larutan PBS pada suhu  $90^{\circ}\text{C}$  selama 20 menit. Setelah itu, campuran diblender hingga halus kemudian disentrifugasi pada suhu ruang dengan kecepatan 4500 rpm selama 15 menit dan diambil supernatannya sebagai substrat ikan peperek. Pembuatan konsentrasi substrat ikan peperek dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Pembuatan konsentrasi substrat ikan peperek

Konsentrasi substrat (%)	Substrat ikan peperek ( $\mu\text{L}$ )	Larutan PBS ( $\mu\text{L}$ )	Ekstraselular khamir laut ( $\mu\text{L}$ )
0,5	750	1500	75
0,25	500	2000	125
0,16	333,4	2000	116,7
0,125	250	2000	112,5
0,1	200	2000	110

- Reagen *follin-phenol ciocalteau* dan biuret masing-masing sebanyak 2 mL.

#### B. Prosedur Kerja

- Substrat ikan peperek dihidrolisis dengan ekstraselular khamir laut pada suhu  $50^{\circ}\text{C}$ , pH 10, dan selama 59 menit.



- Hidrolisis dihentikan dengan meletakkan sampel dalam waterbath pada suhu 80°C selama 20 menit.
- Sampel disentrifus pada suhu 4°C dengan kecepatan 5000 rpm selama 15 menit dan diambil supernatannya.
- Supernatan diambil sebanyak 1 mL dan masing-masing dimasukkan ke dalam dua tabung reaksi.
- Kedua tabung reaksi ditambahkan reagen yang berbeda yakni 2 mL reagen *follin-phenol ciocalteau* dan 2 mL reagen biuret.
- Masing-masing tabung reaksi dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 650 untuk sampel dengan reagen *follin-phenol ciocalteau* sebagai standar tirosin dan panjang gelombang 540 untuk sampel dengan reagen biuret sebagai standar BSA.

### C. Perhitungan $K_M$ dan $V_{maks}$

- Kurva Lineweaver-Burk menyatakan hubungan antara perubahan konsentrasi substrat (sebagai sumbu x) dengan kecepatan reaksi (sebagai sumbu y).
- Perhitungan  $K_M$  dan  $V_{maks}$  dapat dengan menggunakan persamaan regresi linier kurva standar tirosin untuk memperoleh  $v$  (kecepatan) dan persamaan regresi linier kurva standar BSA untuk mengetahui konsentrasi substrat  $[S]$ . Putra (2009) mengatakan bahwa berdasarkan kurva tersebut akan diperoleh persamaan regresi linier  $y = a + bx$ , sehingga perhitungan nilai  $K_M$  dan  $v_{maks}$  adalah sebagai berikut :

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

### 3.3.3 Karakterisasi Aktivitas Hidrolisis Ekstraselular Khamir Laut

#### 3.3.3.1 Penentuan Derajat Hidrolisis

Penentuan derajat hidrolisis dari hidrolisat protein ikan peperek dengan ekstraselular khamir laut menggunakan metode Hoyle dan Merrit (1994). Hidrolisis protein yang dilakukan yakni secara enzimatik, karena tidak mengakibatkan rasemisasi asam amino, tidak terbentuk lisinoalanin yang beracun, mengandung peptida-peptida rantai pendek dengan komposisi asam amino dan berat molekul tertentu (Ekantari, dkk, 2005). Prinsip dasar hidrolisis protein adalah pemutusan ikatan peptida dalam protein yang dapat meningkatkan jumlah gugus bermuatan dan sisi hidrofilik karena membukanya molekul protein, yang pada umumnya akan meningkatkan kelarutan dan derajat hidrolisis (Wijayanti, 2009).

##### A. Preparasi Bahan

- Larutan PBS (*Phosphate Buffer Saline*) sebanyak 50 mL.
- Pembuatan substrat ikan peperek : ikan peperek sebanyak 100 gram direbus pada suhu 90°C dalam 50 mL larutan PBS selama 20 menit. Tujuan perebusan adalah untuk menginaktifkan aktivitas biokimia oleh mikroba yang terkandung dalam ikan peperek. Tujuan penggunaan larutan PBS adalah untuk mempertahankan struktur protein ikan peperek agar tidak rusak saat perebusan pada suhu tinggi. Selanjutnya ikan peperek dibiarkan hingga dingin dan diblender sampai halus kemudian disentrifus pada suhu ruang dengan kecepatan 4500 rpm selama 15 menit untuk diambil supernatannya.
- Supernatan sebanyak 1 mL ditambahkan dengan 2,5% (v/v) ekstraselular khamir laut masing-masing dalam lima buah eppendorf kemudian divorteks.

$$2,5\% \text{ ekstraselular khamir laut} = \frac{\text{Volume ekstraselular khamir laut}}{1 \text{ mL substrat ikan peperek}} \times 100\%$$

Volume ekstraselular khamir laut = 0,025 mL atau 25  $\mu$ L.

- Campuran dimasukkan dalam lima buah eppendorf yang telah dilabeli. Masing-masing eppendorf berisi 1 mL substrat ikan peperek dan 25  $\mu$ L ekstraselular khamir laut.

## B. Prosedur Kerja

### 1. Optimasi Waktu

- Campuran dihidrolisis menggunakan *waterbath shaker* dengan perlakuan waktu 0, 25, 50, 75, dan 100 menit pada suhu 50°C dengan pH 9.
- Hidrolisis dihentikan dengan memasukkan sampel pada *waterbath* dengan suhu 80°C selama 20 menit.
- Diuji N total dan terlarut untuk perhitungan derajat hidrolisis untuk mengetahui waktu optimum hidrolisis.

### 2. Optimasi Suhu

- Campuran dihidrolisis menggunakan *waterbath shaker* dengan perlakuan suhu 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, dan 55°C pada suhu 50°C dengan pH 9 menggunakan waktu optimum hidrolisis.
- Hidrolisis dihentikan dengan memasukkan sampel pada *waterbath* dengan suhu 80°C selama 20 menit.
- Diuji N total dan terlarut untuk perhitungan derajat hidrolisis untuk mengetahui suhu optimum hidrolisis.

### 3. Optimasi pH

- Campuran dihidrolisis menggunakan *waterbath shaker* dengan pH 8, 9, 10, 11, dan 12 menggunakan waktu dan suhu optimum yang diperoleh.



- Hidrolisis dihentikan dengan memasukkan sampel pada waterbath dengan suhu 80°C selama 20 menit.
- Diuji N total dan terlarut untuk perhitungan derajat hidrolisis untuk mengetahui pH optimum hidrolisis.

#### 4. Optimasi Konsentrasi Substrat

- Campuran dihidrolisis menggunakan *waterbath shaker* dengan konsentrasi substrat 0,1%; 0,125%; 0,16%; 0,25%; dan 0,5% menggunakan waktu, suhu, dan pH optimum yang diperoleh. Konsentrasi substrat tersebut merupakan perbandingan dari ekstraselular khamir laut dan substrat ikan peperek yang dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Perbandingan konsentrasi ekstraselular khamir laut dan substrat ikan peperek

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

- Hidrolisis dihentikan dengan memasukkan sampel pada waterbath dengan suhu 80°C selama 20 menit.
- Diuji N total dan terlarut untuk perhitungan derajat hidrolisis untuk mengetahui optimasi konsentrasi substrat saat hidrolisis.

#### C. Perhitungan Derajat Hidrolisis (DH) :

Haslaniza *et al* (2010) mengatakan bahwa derajat hidrolisis suatu bahan dapat diukur dengan rumus berikut :

$$\%DH = \frac{N \text{ Terlarut dalam TCA } 10\% \left(\frac{b}{a}\right)}{N \text{ Total}} \times 100\%$$

Setelah itu, dibuat kurva regresi polinomial yang menyatakan hubungan antara derajat hidrolisis (sumbu x) serta waktu, suhu, pH, dan konsentrasi substrat (sumbu y) untuk memperoleh kondisi optimasi hidrolisis dari perlakuan tersebut.

### 3.3.3.2 Penentuan Berat Molekul Protein Hidrolisat Ikan Peperek

Penentuan berat molekul protein dari hidrolisat ikan peperek menggunakan metode elektroforesis gel atau SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Electrophoresis*) (Aulanni'am, 2005). Prinsip analisis SDS-PAGE, yaitu pemisahan protein berdasarkan ukuran molekul. Deterjen ionik (SDS) akan bereaksi dengan protein dan membentuk kompleks yang mengandung muatan negatif sehingga pergerakan protein dalam medan listrik hanya didasarkan pada ukuran molekul. Protein yang berukuran kecil akan bergerak lebih cepat dibandingkan dengan protein berukuran besar.

#### A. Preparasi Bahan

- Larutan PBS (*Phosphate Buffer Saline*) sebanyak 100 mL.
- Pembuatan supernatan ikan peperek : ikan peperek sebanyak 100 gram direbus dalam 50 mL larutan PBS pada suhu 90°C selama 20 menit. Kemudian campuran diblender sampai halus dan disentrifus pada suhu ruang dengan kecepatan 4500 rpm selama 15 menit untuk diambil supernatannya.
- Pembuatan hidrolisat protein ikan peperek : ikan peperek sebanyak 100 gram direbus dalam 50 mL larutan PBS pada suhu 90°C selama 20 menit. Kemudian campuran diblender sampai halus dan disentrifus pada suhu ruang dengan kecepatan 4500 rpm selama 15 menit untuk diambil supernatannya. Supernatan ikan peperek ditambahkan ekstraselular khamir laut dengan konsentrasi 0,4% kemudian dihidrolisis menggunakan

*waterbath shaker* menggunakan suhu 50°C selama 59 menit pada pH 10.

Selanjutnya dihentikan reaksi hidrolisis menggunakan *waterbath* pada suhu 80°C selama 20 menit.

- Bahan dalam pembuatan sumur gel yang terdiri dari gel pemisah/*separating gel* (12,5%) dan gel pengumpul/*stacking gel* (12,5%).

Komposisi pembuatan gel dapat dilihat pada Tabel 7 dan 8.

Tabel 7. Komposisi Gel Pemisah (*separating gel*) (12,5%) :

Komposisi	1 slab (µL)
Acrylamide 30%	2063
Tris-Cl 1,5 M pH 8,8	1250
dd H <sub>2</sub> O	1635
SDS 10%	50
APS 10%	50
TEMED	10

Tabel 8. Komposisi Gel Pengumpul (*stacking gel*) (12,5%) :

Komposisi	1 slab (µL)
Acrylamide 30%	257,5
Tris-Cl 1 pH 8,8	312,5
dd H <sub>2</sub> O	662,5
SDS 10%	12,5
APS 10%	3,75
TEMED	2,5

- Larutan RSB (*Reducing Sample Buffer*)
- Pembuatan larutan *destaining* dan *staining* dapat dilihat pada Tabel 9 dan 10.

Tabel 9. Pembuatan larutan *destaining*

Bahan	Takaran (cc)
Metanol	20
Asam asetat glasial	10
Akuades	100



Tabel 10. Pembuatan larutan *staining*

Bahan	Takaran
Coomasie blue (gr)	0,1
Metanol (cc)	40
Asam asetat glasial (cc)	10
Akuades (cc)	100

#### B. Prosedur Kerja

- Sampel yang akan *dirunning* disiapkan dan ditambahkan larutan RSB (*Reducing Sample Buffer*) dengan perbandingan 1:1 (v/v).
- Sampel dipanaskan dalam air mendidih selama 5 menit. Tujuannya adalah untuk menonaktifkan enzim dan memutus rantai polimer protein.
- Sampel dan *marker* dimasukkan ke dalam 10 sumuran gel masing-masing sebanyak 20  $\mu$ L.
- Sampel *dirunning* pada tegangan 120 Volt selama  $\pm$  90 menit. *Running sample* merupakan proses pemisahan protein dimana protein akan bergerak dari elektroda negatif menuju elektroda positif. Proses ini selesai ketika warna pelacak atau *tracking dye* mencapai jarak 0,5 cm dari dasar gel.
- Elektroforesis dilakukan hingga pita mencapai batas akhir dari gel.
- Sampel direndam pada larutan *distaining* selama 20-30 menit. Selanjutnya sampel direndam pada larutan *destaining* hingga pita protein pada gel terlihat dan warna gel tidak terlalu biru. Ikatan protein akan tampak dalam gel SDS-PAGE.

#### C. Perhitungan Mobilitas Relatif menggunakan rumus $R_f$ (*Retardaction factor*)

Putra (2011) mengatakan bahwa penentuan berat molekul dilakukan dengan menghitung nilai fraksi *Retardation factor* ( $R_f$ ) dari masing-masing pita protein dengan rumus sebagai berikut :

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

### 3.3.3.3 Penentuan Profil Asam Amino Hidrolisat Protein Ikan Peperek

Penentuan profil asam amino dari hidrolisat protein ikan peperek menggunakan metode HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Prinsip kerja dari metode HPLC adalah memisahkan setiap komponen dalam sampel untuk selanjutnya diidentifikasi (kualitatif) dan dihitung berapa konsentrasi dari masing-masing komponen tersebut (kuantitatif) sebagai hasil dari proses migrasi diferensial dimana komponen-komponen sampel ditahan secara selektif oleh fase diam (Nianda, 2008).

#### A. Persiapan Bahan

- Larutan PBS (*Phosphate Buffer Saline*) sebanyak 100 mL.
- Pembuatan supernatan ikan peperek : ikan peperek sebanyak 100 gram direbus dalam 50 mL larutan PBS pada suhu 90°C selama 20 menit. Kemudian campuran diblender sampai halus dan disentrifus pada suhu ruang dengan kecepatan 4500 rpm selama 15 menit untuk diambil supernatannya.
- Pembuatan hidrolisat protein ikan peperek : ikan peperek sebanyak 100 gram direbus dalam 50 mL larutan PBS pada suhu 90°C selama 20 menit. Kemudian campuran diblender sampai halus dan disentrifus pada suhu ruang dengan kecepatan 4500 rpm selama 15 menit untuk diambil supernatannya. Supernatan ikan peperek ditambahkan ekstraselular khamir laut dengan konsentrasi 0,4% kemudian dihidrolisis menggunakan *waterbath shaker* menggunakan suhu 50°C selama 59 menit pada pH 10.

Selanjutnya dihentikan reaksi hidrolisis menggunakan waterbath pada suhu 80°C selama 20 menit.

- Hidrolisat protein ikan peperek ditambahkan ke dalam HCl 6 N, kemudian dipanaskan dalam oven pada suhu 100°C selama 24 jam. Tujuan pemanasan ini adalah untuk menghilangkan gas atau udara yang ada pada sampel agar dapat menghasilkan kromatogram yang baik, selain itu tujuan pemanasan adalah untuk mempercepat reaksi hidrolisis. dan waktu yang ditentukan. Selanjutnya dinetralkan pada pH 7 menggunakan NaOH 6 N kemudian disaring menggunakan kertas saring *Whatman* 0,2 µm untuk mengambil filtratnya.
- Bufer borat sebanyak 3,092 gram dalam 100 mL akuabides..
- Larutan OPA (o-ftalaldehid).

#### B. Prosedur Kerja

- Filtrat ikan peperek dan hidrolisat protein ikan peperek diambil masing-masing sebanyak 25 µL dan ditambahkan larutan OPA sebanyak 300 µL.
- Masing-masing sampel dihomogenkan dengan vortek selama 5 menit.
- Sampel diinjeksikan kedalam *injector* HPLC sebanyak 5µL.
- Diperoleh kromatogram.

#### C. Perhitungan Konsentrasi Asam Amino

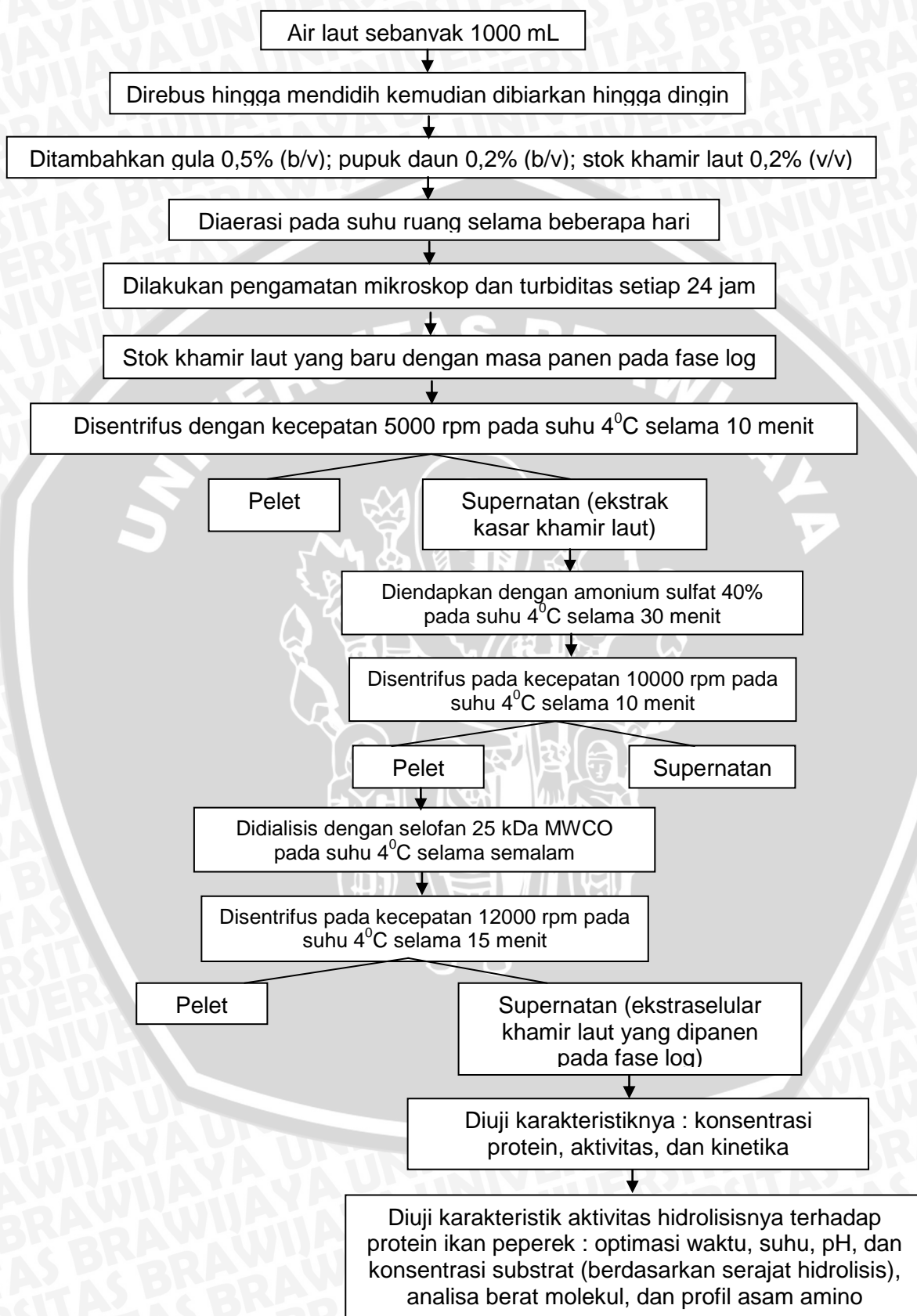
- Konsentrasi Asam Amino (pmol/5µL) :

$$\frac{\text{luas area sampel}}{\text{luas area standar}} \times [\text{standar}] \times \frac{\text{vol. injeksi sampel}}{\text{vol. injeksi standar}}$$

- Dikonversikan kedalam µg/gr.



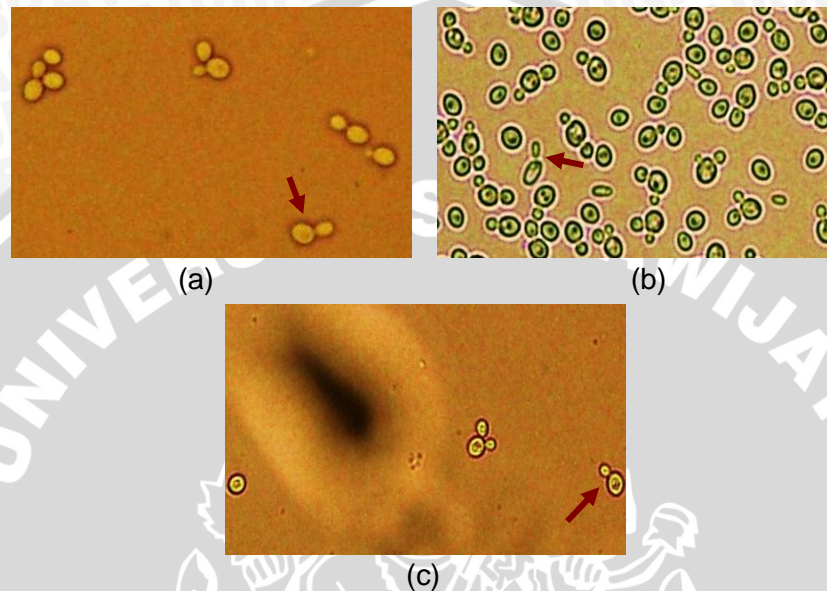
### 3.4 Alur Penelitian



#### 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

##### 4.1 Isolasi dan Penentuan Masa Pertumbuhan Optimum Khamir Laut

Sel-sel khamir laut yang terbentuk selama masa kultur dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Sel khamir laut pada jam ke-24 (a), ke-48 (b), dan ke-72 (c) dengan pembesaran 1000x  
Keterangan : Anak panah menunjukkan *budding* pada sel khamir laut

Gambar 2 menunjukkan bahwa bentuk sel khamir laut berupa oval dan ada tonjolan kecil yang menempel di atasnya yang menandakan sedang terjadi pertunasan (*budding*). Bhat and Kachwalla (1954) mengatakan bahwa morfologi khamir laut secara umum yakni berbentuk bulat hingga oval, berpasangan dan ada pula yang tidak berpasangan yang membentuk suatu kumpulan sel. Selain itu sel-sel yang dihasilkan menunjukkan reproduksi aseksual dengan pertunasan (*budding*). Gandjar dan Sjamsuridzal (2006) juga mengatakan bahwa pada pertunasan khamir terlihat ukuran sel yang lebih besar yang merupakan sel induk dan sel yang lebih kecil yang menempel pada sel induk merupakan sel anak. Ukuran dari sel induk tetap sedangkan sel anak akan bertambah besar sampai pada suatu saat akan terlepas dari sel induknya.



Gambar 2 menunjukkan bahwa sel-sel khamir laut telah mengalami pertumbuhan dan pembelahan selama masa pengamatan. Gambar 2 (a) menunjukkan bahwa sel khamir laut tampak mulai berkembang biak, akan tetapi jumlah sel yang tumbuh masih sedikit. Hal ini menunjukkan bahwa pada masa kultur ini sel khamir laut ada pada fase lag. Pada fase lag, pertumbuhan sel terjadi secara lambat, karena sel mempersiapkan diri untuk menghadapi pembelahan diri (Rahim 2009).

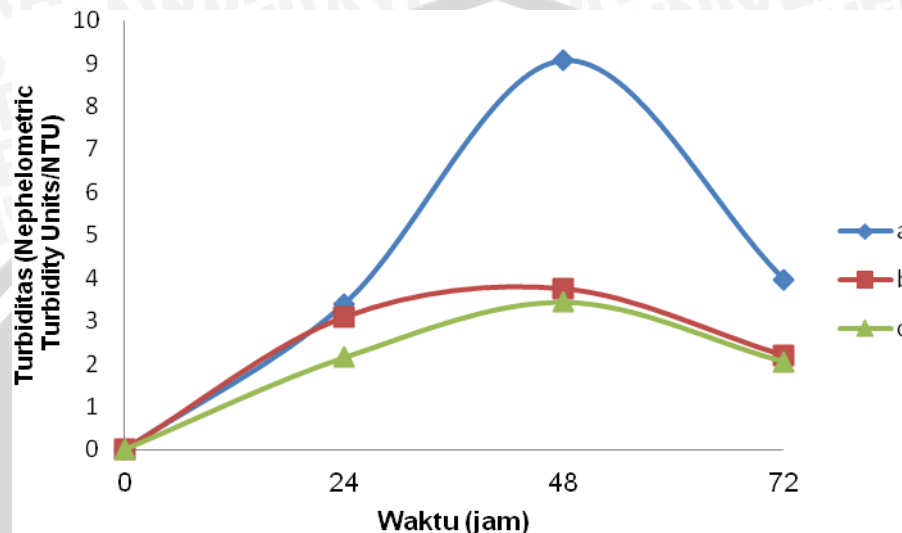
Gambar 2 (b) menunjukkan bahwa pada masa kultur ini sel khamir laut mengalami peningkatan jumlah. Hal ini dapat dilihat dari semakin banyak jumlah sel yang tumbuh dan fase ini dapat disebut sebagai fase pertumbuhan logaritmik. Fase pertumbuhan logaritmik merupakan periode aktif sel untuk reproduksi dan metabolisme (Apriani 2008). Pada fase ini, jumlah sel mikroba sangat banyak, sehingga aktivitas sel juga ikut meningkat.

Gambar 2 (c) menunjukkan bahwa pertumbuhan sel khamir laut pada masa kultur ini telah mengalami pengurangan jumlah sel. Pada masa kultur ini pertumbuhan sel khamir laut mengalami fase kematian. Fase ini ditandai dengan jumlah sel yang mati lebih banyak dari jumlah sel yang masih hidup (Gandjar 2006). Kematian sel-sel khamir laut pada fase ini dapat disebabkan oleh dua hal, pertama yakni ketidakseimbangan antara jumlah sel yang ada dengan nutrisi yang tersedia, dimana sel organisme yang ada lebih banyak dibanding nutrisi yang ada. Kedua yakni banyaknya metabolit hasil metabolisme sel hidup, dimana bila metabolit ini ada dalam jumlah yang berlebih akan dapat mengganggu metabolisme sel dan akhirnya dapat membunuh sel. Apriani (2008) mengatakan bahwa kematian sel disebabkan habisnya sejumlah nutrisi atau akibat terjadinya penimbunan senyawa tertentu hasil metabolisme yang bersifat racun bagi sel (Apriani 2008). Gambar 2 (c) juga memperlihatkan adanya penimbunan yang



cukup banyak pada bagian bawah permukaan, sedangkan sel yang masih hidup terlihat jelas di bagian permukaan, namun dalam jumlah yang sedikit.

Kerapatan biomassa sel khamir laut yang diamati berdasarkan tingkat kekeruhan (turbiditas) dari media air laut dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Tingkat kekeruhan (turbiditas) khamir laut pada masa kultur

Keterangan : a. Pengenceran  $10^{-1}$   
b. Pengenceran  $10^{-2}$   
c. Pengenceran  $10^{-3}$

Gambar 3 menunjukkan bahwa titik optimasi pertumbuhan khamir laut terdapat pada jam ke-48. Hal ini dikarenakan pada masa kultur tersebut jumlah sel khamir laut yang tumbuh sangat banyak sehingga menyebabkan tingginya kekeruhan pada media air laut. Tingginya kekeruhan yang terjadi menandakan semakin tinggi kepadatan sel khamir laut yang menyebabkan media air laut tidak mampu meneruskan cahaya, melainkan cahaya akan dibiaskan oleh sel-sel khamir laut dan mengakibatkan tingginya nilai turbiditas yang terbaca dari hasil pembiasan cahaya. Awwalurrizki dan Putra (2008) mengatakan bahwa tingginya densitas optik yang dihamburkan oleh partikel-partikel mikroba yang ada pada media pertumbuhan dikarenakan terjadi peningkatan populasi dari mikroba.

Gambar 3 juga menunjukkan menunjukkan kurva pertumbuhan khamir laut, dimana fase lag terjadi pada jam ke-0 sampai ke-24 yang ditandai dengan pertumbuhan yang masih lambat dikarenakan sel khamir laut beradaptasi dengan lingkungan pertumbuhannya. Fase log terjadi diatas jam ke-24 hingga jam ke-48 yang ditandai dengan pertumbuhan yang meningkat drastis dikarenakan sel mengkonsumsi substrat yang ada sehingga tumbuh dan berkembang biak dengan cepat. Fase kematian terjadi di atas jam ke-48 hingga jam ke-72 yang ditandai dengan penurunan pertumbuhan khamir laut secara drastis dikarenakan substrat mulai habis, sehingga sel tidak dapat menkonsumsinya dan pada akhirnya sel mengalami kematian. Held (2010) mengatakan bahwa fase pertumbuhan khamir dimulai dari fase lag, yakni pertumbuhan masih belum terjadi, karena sel masih beradaptasi dengan lingkungan pertumbuhannya. Fase pertumbuhan selanjutnya adalah fase logaritmik, dimana sel tumbuh dan membelah diri dengan cepat. Peningkatan waktu pertumbuhan dapat menyebabkan pertumbuhan sel mulai mengalami penurunan karena ketersediaan nutrisi yang menurun dan mengakibatkan kematian sel yang lebih banyak karena tidak dapat mengkonsumsi substrat. Gandjar (2006) mengatakan bahwa penurunan pertumbuhan sel yang drastis disebabkan oleh habisnya sejumlah nutrisi atau akibat terjadinya penimbunan senyawa tertentu hasil metabolisme yang bersifat racun bagi sel khamir laut (Apriani 2008).

Gambar 3 juga menunjukkan bahwa nilai turbiditas tertinggi terdapat pada pengenceran  $10^{-1}$  dan menurun pada tingkat pengenceran berikutnya. Hal ini dikarenakan tujuan dari pengenceran bertingkat adalah untuk mengurangi jumlah mikroba yang terlarut pada cairan sehingga pada pengenceran  $10^{-1}$  jumlah sel khamir laut masih tinggi sedangkan pada pengenceran berikutnya jumlah sel khamir laut semakin berkurang. Selain itu pada pengenceran  $10^{-1}$ , jumlah khamir

laut yang mengkonsumsi nutrisi pada media pertumbuhan sangat banyak sehingga media pertumbuhan dipenuhi oleh sel khamir laut dan menyebabkan tingginya kekeruhan yang terjadi. Kemudian pada pengenceran berikutnya jumlah sel khamir laut lebih rendah dibandingkan media pertumbuhan sehingga nutrisi yang tersedia cukup tinggi. Namun, sel-sel khamir laut tersebut telah mengkonsumsi nutrisi dalam media pertumbuhan pada pengenceran sebelumnya sehingga kelebihan nutrisi pada media pertumbuhan menyebabkan sel khamir laut tidak mampu lagi mengkonsumsinya atau telah mengalami kejenuhan dan pada akhirnya sel khamir laut mengalami kematian. Kematian sel khamir laut akan mengurangi tingkat kekeruhan sehingga nilai turbiditas yang dihasilkan rendah. Nannipieri *et al* (2003) mengatakan bahwa jumlah sel bakteri, jamur, dan protozoa akan menurun pada tingkat pengenceran yang lebih tinggi. Jumlah sel yang tinggi menyebabkan tingginya kekeruhan yang pada khamir laut.

#### 4.2 Karakteristik Ekstraselular Khamir Laut

Karakterisasi dari ekstraselular khamir laut yang dipanen pada jam ke-48 dari percobaan ini meliputi, konsentrasi protein, aktivitas enzim, dan kinetika enzim. Karakteristik dari protease ekstraselular khamir laut dapat dilihat pada Tabel 11.

Tabel 11. Karakteristik ekstraselular khamir laut

Karakteristik Ekstraselular Khamir Laut	Jumlah
Konsentrasi protein (mg/mL)	121
Aktivitas enzim (U/mL/menit)	0,2112
Aktivitas spesifik enzim (U/mg)	1,745
Kinetika enzim :	
- $K_M$ (mM)	$1,4255 \times 10^3$
- $V_{Maks}$ (mmol/menit/mg)	0,0594



#### 4.2.1 Konsentrasi Protein Ekstraselular Khamir Laut

Tabel 11 memperlihatkan bahwa konsentrasi protein khamir laut yang dipanen pada jam ke-48 lebih besar hampir dua kali lipat dibandingkan konsentrasi protein khamir laut yang dipanen hari ke 7-10 (Syafii, 2011). Hal ini disebabkan khamir laut yang dipanen pada jam ke-48 terdiri dari sel khamir laut yang masih hidup. Pratama (2011) mengatakan bahwa semakin meningkat jumlah sel maka kadar protein juga meningkat. Jaspian *et al.* (2003) juga menambahkan bahwa tingginya kadar protein dapat menggambarkan banyaknya sel. Cox (2003) juga menggambarkan bahwa sel menggunakan 95% dari energi yang dimilikinya untuk mensintesis protein, sehingga semakin banyak sel yang terbentuk, maka semakin tinggi pula protein yang disintesis oleh sel.

Konsentrasi protein pada penelitian ini masih lebih tinggi satu kali lipat dibandingkan konsentrasi protein pada penelitian Chi *et al* (2009). Hal ini diduga karena ekstraselular khamir laut yang dipanen pada jam ke-48 masih memiliki tingkat kemurnian yang rendah. Tingkat kemurnian yang rendah dapat disebabkan oleh adanya senyawa pengotor enzim yang ikut terbaca pada saat pengukuran konsentrasi protein. Selain itu, tingginya konsentrasi protein diduga karena adanya sel-sel khamir laut baik yang hidup maupun yang telah mati yang juga ikut terbaca pada saat pengukuran konsentrasi protein.

#### 4.2.2 Aktivitas Ekstraselular Khamir Laut

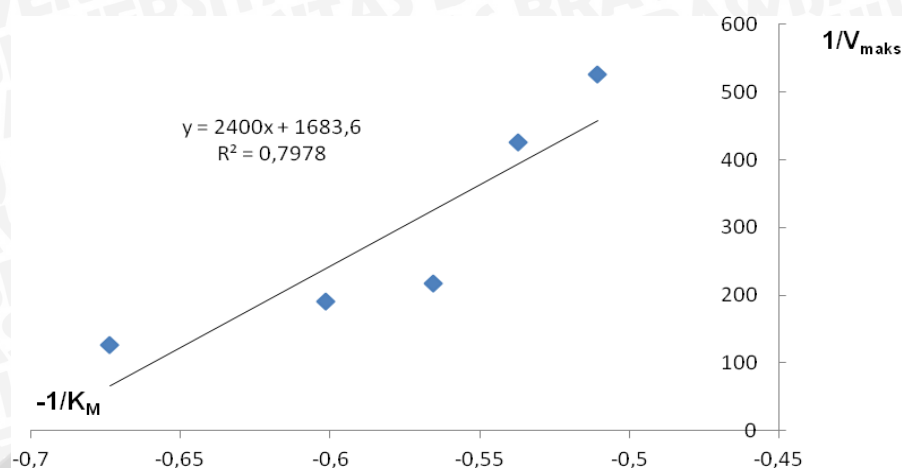
Tabel 11 juga menunjukkan bahwa aktivitas ekstraselular khamir laut yang dipanen pada jam ke-48 lebih tinggi tiga kali lipat dibandingkan yang dipanen pada hari ke 7-10 oleh Syafii (2011). Hal ini disebabkan pada jam ke-48 jumlah sel yang dihasilkan sangat banyak sehingga dimungkinkan dengan banyaknya sel yang tumbuh dan berkembang biak dengan cepat akan

menghasilkan aktivitas sel yang tinggi pula. Maranatha (2008) mengatakan bahwa aktivitas enzim meningkat seiring dengan pertumbuhan selnya.

Aktivitas ekstraselular dan aktivitas spesifik ekstraselular khamir laut pada penelitian ini masing-masing memiliki nilai yang lebih rendah sebanyak 34 kali lipat dan 357 kali lipat dibandingkan hasil penelitian Chi *et al* (2009). Hal ini dikarenakan tingkat kemurnian ekstraselular yang dari khamir laut yang dipanen pada jam ke-48 masih rendah. Rendahnya kemurnian dari ekstraselular khamir laut dapat disebabkan oleh adanya senyawa pengotor seperti sulfur atau logam yang berasal dari media pertumbuhan. Dewi (2006) mengatakan bahwa pemurnian enzim ekstraselular bertujuan memisahkan senyawa pengotor yang berasal dari media pertumbuhan. Pemurnian ekstraselular khamir laut yang tidak maksimal dapat menyebabkan senyawa pengotor tertinggal dan menghambat aktivitas ekstraselular khamir laut. Kiswanto (2004) menambahkan bahwa jumlah kontaminan yang tinggi pada enzim dapat menghalangi sisi aktif enzim untuk berikatan dengan substrat.

#### 4.2.3 Kinetika Ekstraselular Khamir Laut

Gambar 4 menunjukkan kinetika dari ekstraselular khamir laut berdasarkan persamaan Lineweaver-Burk.



Gambar 4. Persamaan Lineweaver-Burk ekstraselular khamir laut

Tabel 11 menunjukkan bahwa  $-1/K_M$  merupakan sumbu x dan  $1/V_{maks}$  merupakan sumbu y, dimana nilai  $K_M$  dari ekstraselular khamir laut yang dipanen pada jam ke-48 lebih rendah hampir dua kali lipat dibandingkan dengan yang dipanen pada hari ke 7-10 hasil penelitian Syafii (2011). Nilai  $K_M$  yang rendah menggambarkan afinitas enzim yang tinggi terhadap substrat, sedangkan nilai  $K_M$  yang tinggi menggambarkan afinitas enzim yang rendah terhadap substrat (Anam, 2010). Artinya nilai  $K_M$  yang rendah dari ekstraselular khamir laut yang dipanen pada jam ke-48 menggambarkan tingginya afinitas ekstraselular khamir laut tersebut terhadap substrat ikan peperek.

Nilai  $K_M$  dari penelitian ini masih lebih tinggi hampir enam kali lipat dibandingkan dengan penelitian Chi *et al* (2009). Hal ini dimungkinkan karena ekstraselular khamir laut yang dipanen pada jam ke-48 masih memiliki senyawa pengotor yang menghambat ekstraselular untuk berikatan dengan substrat sehingga afinitas antara ekstraselular dan substrat masih rendah.

Tabel 11 juga menunjukkan nilai  $V_{maks}$  atau kecepatan maksimum yang diperoleh dari khamir laut yang dipanen pada jam ke-48 lebih rendah 141 kali lipat dibandingkan pada dari khamir laut yang dipanen pada hari ke 7-10 hasil penelitian Syafii (2011). Hal ini dimungkinkan karena jumlah sel khamir laut yang



dipanen pada jam ke-48 memiliki jumlah sel yang sangat banyak. Codd *et al.* (1988) mengatakan bahwa nilai  $V_{maks}$  berbanding terbalik dengan molalitas, jumlah sel, dan waktu, sehingga karena jumlah sel khamir laut yang dipanen pada jam ke-48 sangat banyak, maka nilai nilai  $V_{maks}$  yang dihasilkan rendah.

Nilai  $V_{maks}$  pada penelitian ini masih lebih tinggi dua kali lipat dibandingkan hasil penelitian oleh Chi *et al* (2009). Hal ini dimungkinkan karena ekstraselular khamir laut yang dipanen pada jam ke-48 masih memiliki tingkat kemurnian yang rendah. Rendahnya tingkat kemurnian tersebut disebabkan oleh masih terdapatnya senyawa pengotor pada media pertumbuhan yang akan menghambat sel untuk mengkonsumsi substrat. Akibatnya sel mengalami kematian dan jumlah sel yang tumbuh akan berkurang. Rendahnya jumlah sel yang tumbuh menyebabkan nilai  $V_{maks}$  yang dihasilkan tinggi, karena nilai  $V_{maks}$  berbanding terbalik dengan jumlah sel.

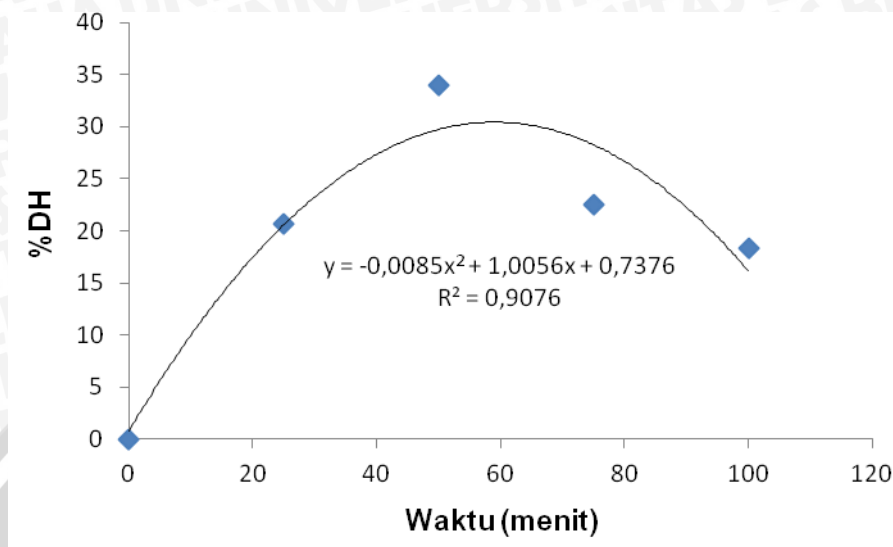
#### **4.3 Karakteristik Aktivitas Hidrolisis Ekstraselular Khamir Laut**

Karakteristik aktivitas hidrolisis ekstraselular khamir laut konsentrasi  $10^{-1}$  yang dipanen pada jam ke-48 terhadap ikan peperek meliputi penentuan kondisi optimasi dari waktu, pH, suhu berdasarkan derajat hidrolisis, konsentrasi substrat berdasarkan aktivitas ekstraselular khamir laut, dan berat molekul berdasarkan metode SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Poliacrylamide Gel Electrophoresis*), dan profil asam amino hidrolisat protein ikan peperek.

##### **4.3.1 Derajat Hidrolisis**

###### **4.3.1.1 Optimasi Waktu**

Pengaruh perlakuan waktu yang berbeda terhadap derajat hidrolisis protein ikan peperek oleh ekstraselular khamir laut, dapat dilihat pada Gambar 5.



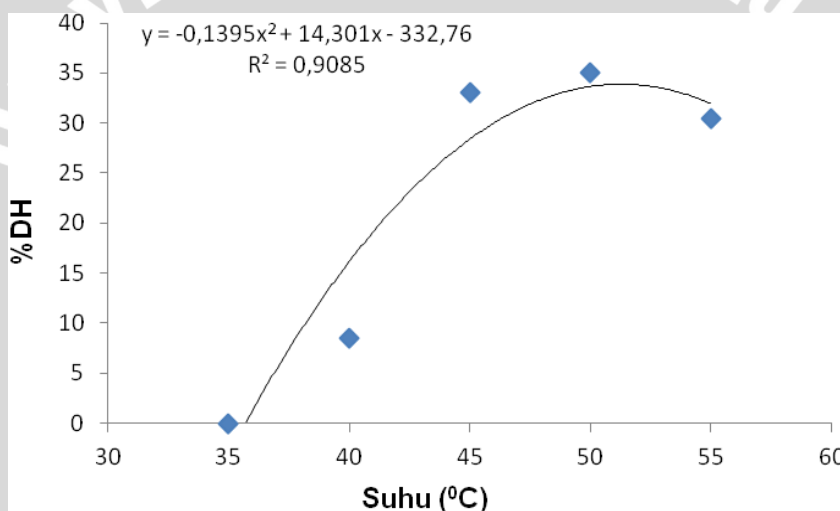
Gambar 5. Derajat hidrolisis protein ikan peperek oleh ekstraselular khamir laut pada berbagai waktu hidrolisis

Gambar 5 menunjukkan bahwa waktu optimum ekstraselular khamir laut dalam menghidrolisis ikan peperek adalah selama 59 menit dengan derajat hidrolisis sebesar 30,46%. Waktu tersebut lebih cepat dibandingkan dengan waktu optimum dari khamir laut yang dipanen pada hari ke 7-10 yakni selama 62 menit dengan derajat hidrolisis 6,6% (Syafii 2011). Hal ini disebabkan ekstraselular dari khamir laut yang dipanen pada jam ke-48 memiliki jumlah sel yang sangat banyak serta aktivitas enzim yang lebih tinggi dibandingkan dengan ekstraselular dari khamir laut yang dipanen pada hari ke 7-10, sehingga hanya membutuhkan waktu yang lebih singkat dalam menghidrolisis ikan peperek. Selain itu, derajat hidrolisis pada penelitian ini lebih tinggi hampir lima kali lipat dibandingkan pada penelitian Syafii (2011) yang menggunakan khamir laut yang dipanen pada hari ke 7-10. Hal ini disebabkan karena aktivitas yang dimiliki oleh ekstraselular khamir laut yang dipanen pada jam ke-48 lebih tinggi tiga kali lipat dibandingkan aktivitas ekstraselular khamir laut yang dipanen pada hari ke 7-10, maka dengan aktivitas yang tinggi maka ekstraselular khamir laut dapat

menghidrolisis protein ikan peperek lebih banyak sehingga mengakibatkan tingginya derajat hidrolisis yang dihasilkan. Maranatha (2008) mengatakan bahwa aktivitas enzim meningkat seiring dengan pertumbuhan selnya, sehingga semakin banyak sel yang tumbuh maka semakin tinggi aktivitas yang terjadi, dan mengakibatkan waktu yang dibutuhkan dalam hidrolisis semakin singkat.

#### 4.3.1.2 Perlakuan Suhu

Pengaruh perlakuan suhu yang berbeda terhadap derajat hidrolisis protein ikan peperek oleh ekstraselular khamir laut, dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Derajat hidrolisis protein ikan peperek oleh ekstraselular khamir laut dalam berbagai suhu hidrolisis

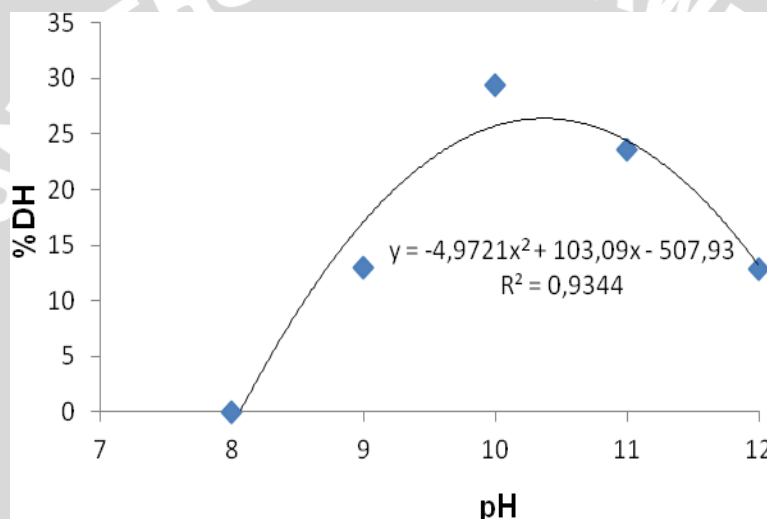
Gambar 6 menunjukkan bahwa suhu optimum yang digunakan oleh ekstraselular khamir laut dalam menghidrolisis ikan peperek adalah pada suhu 50°C dengan derajat hidrolisis sebesar 30,46%. Suhu tersebut kurang lebih sama dengan suhu optimum dialisat ekstraselular dari khamir laut yang dipanen pada hari ke 7-10, namun dengan derajat hidrolisis sebesar 24% (Syafii 2011). Abdullah (2006) mengatakan bahwa sebagian besar dari protease ekstraselular dapat aktif pada kisaran suhu 40-55°C. Perbedaan derajat hidrolisis yang terjadi disebabkan karena aktivitas ekstraselular khamir laut yang dipanen pada jam ke-



48 lebih tinggi tiga kali lipat dibandingkan khamir laut yang dipanen pada hari ke 7-10 oleh Syafii (2011), sehingga memiliki kemampuan yang tinggi dalam menghidrolisis protein ikan peperek dan mengakibatkan tingginya derajat hidrolisis yang dihasilkan.

#### 4.3.1.3 Optimasi pH

Pengaruh perlakuan pH yang berbeda terhadap derajat hidrolisis protein ikan peperek oleh ekstraselular khamir laut, dapat dilihat pada Gambar 7.



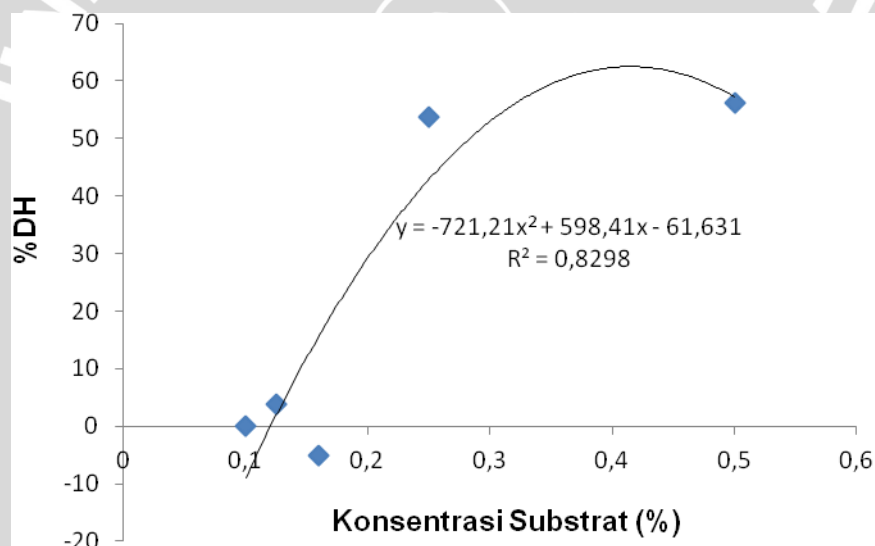
Gambar 7. Derajat hidrolisis protein ikan peperek oleh ekstraselular khamir laut dalam berbagai pH hidrolisis

Gambar 7 menunjukkan bahwa pH optimum ekstraselular khamir laut dalam menghidrolisis ikan peperek yakni pada pH 10 dengan derajat hidrolisis sebesar 25,76%. Hasil tersebut berbeda dengan pH optimum dari ekstraselular khamir laut yang dipanen pada hari ke 7-10 yakni pada pH 9 dengan derajat hidrolisis sebesar 24% (Syafii 2011). Hal ini menandakan bahwa enzim ekstraselular yang dihasilkan oleh khamir laut yang dipanen pada jam ke-48 bersifat lebih basa. Chi *et al.* (2009) mengatakan bahwa pada umumnya kisaran pH optimum untuk protease basa adalah di antara pH 9-11. Perbedaan derajat hidrolisis yang terjadi disebabkan karena aktivitas ekstraselular khamir laut yang

dipanen pada jam ke-48 lebih tinggi tiga kali lipat dibandingkan khamir laut yang dipanen pada hari ke 7-10 oleh Syafii (2011). Aktivitas enzim yang lebih tinggi mengakibatkan tingginya kemampuan ekstraselular khamir laut dalam menghidrolisis protein ikan peperek, sehingga derajat hidrolisis yang dihasilkan lebih tinggi pula.

#### 4.3.1.4 Optimasi Konsentrasi Substrat

Pengaruh perlakuan konsentrasi substrat yang berbeda terhadap derajat hidrolisis protein ikan peperek oleh ekstraselular khamir laut, dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Derajat hidrolisis protein ikan peperek oleh ekstraselular khamir laut dalam berbagai konsentrasi substrat

Gambar 8 menunjukkan bahwa konsentrasi optimum substrat yang dihidrolisis oleh ekstraselular khamir laut adalah sebesar 0,4% dengan derajat hidrolisis sebesar 62,34%. Konsentrasi substrat tersebut merupakan perbandingan antara ekstraselular khamir laut dengan substrat ikan peperek. Purbowatiningrum dkk (2004) mengatakan bahwa peningkatan konsentrasi substrat akan meningkatkan laju reaksi katalitik enzim, hingga pada konsentrasi substrat tertentu enzim menjadi jenuh oleh substrat dan tidak dapat berfungsi

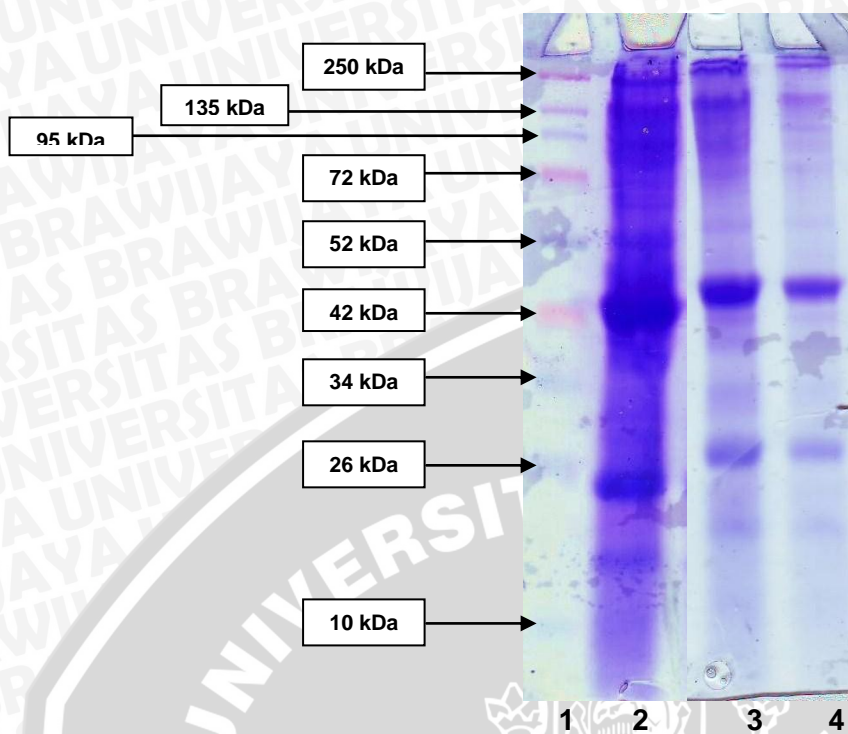
lebih cepat lagi. Laju reaksi pada saat itu dikatakan sebagai laju aktivitas maksimum enzim.

Gambar 8 juga menunjukkan bahwa setelah mencapai kondisi optimum, pada penambahan konsentrasi substrat selanjutnya, terjadi penurunan nilai derajat hidrolisis. Hal ini disebabkan pada penambahan substrat setelah melalui kondisi optimum membuat enzim jenuh dengan substrat sehingga enzim tidak dapat mengkatalis lagi substrat tersebut dan mengakibatkan terjadinya penurunan derajat hidrolisis. Hartati dkk (2003) mengatakan bahwa peningkatan kadar substrat akan meningkatkan laju reaksi sampai mencapai titik tertentu sampai enzim jenuh terhadap substrat, sehingga penambahan kadar substrat tidak dapat lagi meningkatkan laju reaksi.

#### 4.3.2 Berat Molekul

Elektroforesa marker, ikan peperek, dan hidrolisat protein ikan peperek yang dihidrolisis oleh ekstraselular khamir laut selama 59 menit pada suhu  $50^{\circ}\text{C}$ , dan pH 10 dapat dilihat pada Gambar 9. Sementara itu berat molekul marker, peptida ikan peperek, dan hidrolisat protein ikan peperek dapat dilihat pada Tabel 12.





Gambar 9. Pita protein marker, ikan peperek, dan hidrolisat protein ikan peperek

- Keterangan :
1. Marker
  2. Sampel ikan peperek
  3. Sampel HPI tanpa pengenceran
  4. Sampel HPI dengan pengenceran

Tabel 12. Berat Molekul (kDa) Pita Protein Ikan Peperek dan Hidrolisat Protein Ikan Peperek yang Dihidrolisis dengan Ekstraselular Khamir Laut

No.	Ikan Peperek	HPI tanpa Pengenceran	HPI dengan Pengenceran
1.	168,31	-	-
2.	140,40	140,40	140,40
3.	94,78	-	-
4.	-	-	100,69
5.	-	86,57	86,57
6.	76,71	-	-
7.	72,21	-	-
8.	-	70,06	70,06
9.	60,24	-	-
10.	58,44	-	-
11.	-	-	-
12.	50,25	50,25	50,25
13.	45,89	45,89	45,89
14.	-	34,96	34,96
15.	32,91	32,91	-
16.	-	30,98	30,98
17.	-	23,60	23,60
18.	20,29	-	-
19.	17,98	-	-
20.	-	16,93	16,93
<b>Total</b>	<b>12 pita protein</b>	<b>10 pita protein</b>	<b>10 pita protein</b>

Gambar 9 menunjukkan bahwa sampel ikan peperek memiliki pita protein yang lebih tebal dibandingkan sampel hidrolisat protein ikan peperek dengan maupun tanpa pengenceran. Maryati dkk (2009) mengatakan bahwa perbedaan ketebalan ini disebabkan adanya perbedaan jumlah molekul-molekul protein yang termigrasi atau dimungkinkan karena perbedaan kuantitas protein. Sementara itu Jaziri (2010) menyatakan bahwa khamir laut mampu menghidrolisis ikan peperek dengan cara memecah ikatan peptida, hal ini ditandai dengan munculnya pita peptida hidrolisat protein ikan peperek yang lebih tipis dan memiliki berat molekul yang lebih kecil dibandingkan ikan peperek.

Tabel 12 menunjukkan bahwa pita protein pada ikan peperek yang belum dihidrolisis oleh ekstraselular khamir laut memiliki berat molekul sebesar 168 kDa, kemudian terjadi penurunan berat molekul pada sampel ikan peperek yang dihidrolisis oleh ekstraselular khamir laut baik dengan maupun tanpa

pengenceran yakni sebesar 140 kDa. Hal ini menandakan bahwa ekstraselular khamir laut bekerja dalam menghidrolisis protein pada ikan peperek menjadi peptida-peptida yang berukuran lebih kecil.

Pita protein yang tampak pada ikan peperek pada berat molekul lebih dari 50 kDa masih banyak. Hal ini menandakan bahwa migrasi protein yang terjadi masih rendah yang menyebabkan tingginya berat molekul yang dihasilkan dan juga dimungkinkan karena ekstraselular tidak menghidrolisis protein ikan peperek menjadi peptida yang berukuran lebih kecil. Sementara itu pita protein yang tampak pada hidrolisat protein ikan peperek pada berat molekul lebih dari 50 kDa hanya sedikit, artinya ekstraselular khamir laut telah menghidrolisis protein ikan peperek menjadi peptida yang lebih kecil yang ditandai dengan adanya migrasi protein menuju berat molekul yang rendah. Fatmawati dkk (2010) mengatakan bahwa berat molekul yang lebih rendah memiliki kecepatan bermigrasi lebih tinggi yang ditandai dengan letak pita protein yang terbentuk semakin ke bawah.

Pola pita protein pada hidrolisat protein ikan peperek dengan pengenceran hampir serupa dengan pita protein hidrolisat protein ikan peperek tanpa pengenceran yakni menunjukkan berat molekul yang cenderung sama antara 23 kDa sampai 50 kDa. Hal ini menandakan bahwa ekstraselular khamir laut menghidrolisis protein pada ikan peperek yang menyebabkan protein bermigrasi lebih jauh dan mengakibatkan terbentuknya berat molekul yang lebih rendah. Perbedaan yang ditunjukkan oleh pita protein hidrolisat dengan pengenceran yakni munculnya pita protein dengan berat molekul 100 kDa sementara tidak terjadi pada hidrolisat tanpa pengenceran. Hal ini disebabkan oleh protein ikan peperek yang tidak terhidrolisis oleh ekstraselular khamir laut sehingga tidak terjadi migrasi protein yang dapat menurunkan berat molekul.

Pada penelitian ini, protein yang bermigrasi lebih kecil dibandingkan pada penelitian Souissi *et al* (2007) mengenai hidrolisat protein ikan sarden, Lian *et al*.



(2005) mengenai hidrolisat protein cumi-cumi, dan Shamloo *et al* (2012) mengenai hidrolisat protein ikan nila. Berdasarkan ketiga penelitian tersebut migrasi protein yang ditunjukkan tinggi sehingga tidak terdapat pita protein pada berat molekul yang tinggi sebaliknya pita protein yang ditunjukkan semakin banyak pada berat molekul yang lebih rendah. Hal ini menandakan bahwa enzim yang bekerja pada ketiga sampel tersebut hampir sempurna dalam menghidrolisis protein masing-masing sampel yang menyebabkan protein bermigrasi lebih jauh menuju pada berat molekul yang lebih rendah.

Rendahnya protein yang bermigrasi pada penelitian ini diduga karena ekstraselular khamir laut yang tidak secara total menghidrolisis protein ikan peperek. Ekstraselular khamir laut yang tidak menghidrolisis protein ikan peperek secara total diduga karena adanya inhibitor yang menghambat ekstraselular khamir laut dalam menghidrolisis protein ikan peperek. Hal ini sesuai dengan penelitian Agustini (2006) yang menyatakan bahwa adanya senyawa PMSF dan  $\text{CaCl}_2$  dapat menghambat aktivitas protease dari isolat CG-10.

Tabel 12 juga menunjukkan bahwa jumlah pita protein sampel ikan peperek lebih banyak dibandingkan pada sampel hidrolisat protein ikan peperek dengan atau tanpa pengenceran. Hal ini dimungkinkan karena protein ikan peperek belum dihidrolisis oleh ekstraselular khamir laut sehingga pita protein yang dimiliki masih banyak, sedangkan jumlah pita protein pada hidrolisat protein ikan peperek lebih sedikit karena protein yang pada ikan telah dihidrolisis oleh ekstraselular khamir laut. Petersen (1981) mengatakan bahwa enzim menghidrolisis protein dan memperkecil ukuran peptida, yang dapat merubah karakteristik dan meningkatkan kualitas protein. Jumlah pita protein pada penelitian ini berbeda dengan penelitian oleh Syafii (2011) yang menggunakan khamir laut yang dipanen pada hari ke 7-10, dimana pita protein yang dihasilkan pada hidrolisat protein ikan peperek tanpa pengenceran dan dengan

pengenceran masing-masing sebanyak 6 dan 7 pita protein. Hal ini menandakan bahwa ekstraselular khamir laut yang dipanen pada jam ke-48 memiliki kemampuan menghidrolisis protein ikan peperek yang lebih optimal dibandingkan dengan yang dipanen pada hari ke 7-10, yang ditandai dengan banyaknya pita protein yang terbentuk.

#### 4.3.3 Profil Asam Amino

Profil asam amino ikan peperek dan hidrolisat protein ikan peperek yang dihidrolisis oleh ekstraselular khamir laut dapat dilihat pada Tabel 13.

Tabel 13. Kadar asam amino ikan peperek dan hidrolisat protein ikan peperek

No.	Asam Amino	Kadar Asam Amino ( $\mu\text{g/g}$ )		
		Ikan Peperek	a	b
1.	Asam Aspartat	0,2385	0,2539	-
2.	Serin	0,1678	0,6776	-
3.	Asam Glutamat	0,3887	0,2308	-
4.	Glisin	0,4135	0,4898	14,672
5.	Histidin	0,0717	0,2409	-
6.	Arginin	0,1569	0,2478	-
7.	Treonin	0,1130	0,2023	-
8.	Alanin	0,3672	0,4455	-
9.	Prolin	0,2387	0,1911	-
10.	Tirosin	0,0489	0,1474	-
11.	Valin	0,0962	0,1161	-
12.	Metionin	0,0269	0,0159	19,418
13.	Isoleusin	0,0762	0,0969	9,492
14.	Leusin	0,1567	0,1433	20,552
15.	Lisin	-	-	59,64
16.	Fenilalanin	0,0748	0,1284	8,05

Keterangan : **a.** Hidrolisat protein ikan peperek yang dihidrolisis oleh ekstraselular khamir laut yang dipanen pada jam ke-48.  
**b.** Hidrolisat protein ikan peperek yang dihidrolisis oleh ekstraselular khamir laut yang dipanen pada hari ke 7-10 (Syafii, 2011).

Tabel 13 menunjukkan bahwa asam amino yang terkandung dalam ikan peperek dan hidrolisat protein ikan peperek adalah sebanyak 15 asam amino yang terdiri dari asam amino esensial yakni treonin, tirosin, valin, metionin, isoleusin, leusin, dan fenilalanin, serta asam amino non esensial yang meliputi



asam aspartat, serin, asam glutamat, glisin, histidin, arginin, alanin, dan prolin (Arief dan Asnawi 2009). Sebagian besar kadar asam amino yang terkandung dalam hidrolisat protein ikan peperek memiliki jumlah yang lebih tinggi dibandingkan kadar asam amino pada ikan peperek. Hal ini disebabkan karena hidrolisat protein ikan peperek dihidrolisis oleh ekstraselular khamir laut yang mengakibatkan terbebasnya asam-asam amino yang terkandung pada ikan peperek, sehingga menghasilkan kandungan asam amino yang lebih tinggi dibandingkan asam amino pada ikan peperek yang tidak dihidrolisis oleh ekstraselular khamir laut. Purbasari (2008) mengatakan bahwa hidrolisis protein menggunakan enzim akan disertai dengan pembebasan asam amino penyusun molekul protein. Selain itu, peningkatan kandungan asam amino pada hidrolisat protein ikan peperek disebabkan oleh kerja ekstraselular khamir laut yang lebih spesifik dalam membebaskan asam amino tertentu. Berdasarkan Tabel 13, peningkatan kandungan asam amino cenderung terjadi pada kelompok asam amino hidrofilik yakni asam aspartat, serin, glisin, histidin, arginin, dan treonin, sedangkan penurunan kandungan asam amino cenderung terjadi pada kelompok asam amino hidrofobik yakni prolin, metionin, dan leusin. Hal ini menandakan bahwa ekstraselular khamir laut bekerja lebih spesifik dalam menguraikan asam amino yang termasuk dalam kelompok asam amino hidrofilik. Zayas (1997) mengatakan bahwa hidrolisis ikatan peptida dalam protein dapat meningkatkan sisi hidrofilik karena membukanya molekul protein. Sementara itu, Peterson (1981) juga menambahkan bahwa dasar proses hidrolisis enzimatis adalah pemutusan ikatan peptida oleh enzim dengan bantuan air, sehingga akan lebih spesifik dalam menguraikan asam amino yang tergolong hidrofilik.

Asam amino yang terkandung dalam hidrolisat protein ikan peperek yakni asam aspartat, serin, glisin, histidin, treonin, alanin, prolin, tirosin, valin, isoleusin, leusin, dan fenilalanin, akan tetapi tidak semua asam amino yang dihasilkan oleh



hidrolisat protein ikan peperek yang memiliki kadar yang lebih tinggi daripada ikan peperek melainkan menunjukkan kadar yang lebih rendah, contohnya yakni asam glutamat, arginin, prolin, metionin, dan leusin. Hal ini dimungkinkan karena hidrolisis yang dilakukan oleh ekstraselular khamir laut tidak memberikan pengaruh yang besar terhadap kadar asam amino pada hidrolisat protein ikan peperek. Giyatmi dkk (2000) mengatakan bahwa pada penambahan protease yang berasal dari kapang menyebabkan penurunan kadar asam glutamat pada ikan kayu. Rendahnya kadar dari sebagian asam amino juga dimungkinkan karena adanya inhibitor yang terdapat dalam ekstraselular khamir laut yang menghidrolisis protein ikan peperek. Anonimous (2011) mengatakan bahwa inhibitor protease dapat menghambat aktivitas proteolitik dari enzim dan dapat menyebabkan penurunan terhadap kemampuan enzim dalam mencerna protein yang menyebabkan rendahnya asam amino yang dihasilkan.

Tabel 13 juga menunjukkan perbandingan kadar asam amino antara hidrolisat protein ikan peperek dari ekstraselular khamir laut yang dipanen pada jam ke-48 dan yang dipanen pada hari ke 7-10 oleh Syafii (2011), dimana hidrolisat protein ikan peperek yang dihidrolisis oleh ekstraselular khamir laut yang dipanen pada jam ke-48 memiliki asam amino yang lebih lengkap dibandingkan dengan yang dipanen pada hari ke 7-10. Hal ini dimungkinkan karena ekstraselular khamir laut yang dipanen pada jam ke-48 memiliki aktivitas yang tinggi. Aktivitas yang tinggi akan menyebabkan tingginya reaksi hidrolisis enzimatis terhadap protein ikan peperek yang dilakukan oleh ekstraselular khamir laut, sehingga asam amino yang terbebaskan semakin banyak. Namun sebagian besar asam amino yang ada pada hidrolisat protein ikan peperek dari ekstraselular khamir laut yang dipanen pada hari ke 7-10 oleh Syafii (2011) memiliki kandungan asam amino yang lebih tinggi dibandingkan dengan yang dipanen pada jam ke-48. Asam amino tersebut adalah metionin, isoleusin, leusin,

lisin, dan fenilalanin. Rendahnya kadar dari sebagian asam amino juga dimungkinkan karena adanya inhibitor yang terdapat dalam ekstraselular khamir laut. Alarcon *et al.* (2007) mengatakan bahwa inhibitor yang terdapat pada protease menyebabkan turunnya daya cerna enzim terhadap protein diikuti oleh turunnya ketersediaan asam amino.

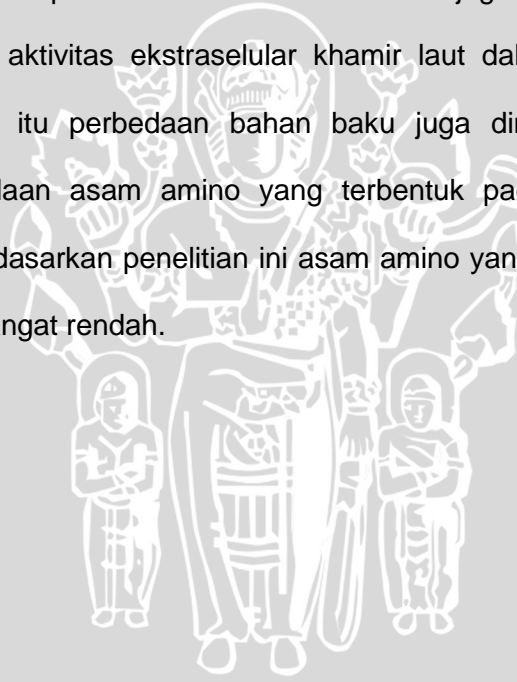
Dari semua asam amino yang ada pada hidrolisat protein ikan peperek, asam amino serin memiliki kandungan yang lebih tinggi. Hal ini menunjukkan bahwa ekstraselular khamir laut yang dipanen pada jam ke-48 yang aktif menghidrolisis protein ikan peperek tergolong protease serin. Protease serin merupakan protease yang mengandung asam amino serin pada sisi aktif enzimnya (Yamin 2008) dan umumnya merupakan endopeptidase (Kusuma 2010). Suhartono (2000) juga menambahkan bahwa golongan protease serin subtilisin ditemukan aktif pada pH antara 8-13 sehingga tergolong protease alkali serta sensitif terhadap adanya inhibitor (Klomklao, 2008).

Tabel 13 juga menunjukkan bahwa ekstraselular khamir laut yang dipanen pada jam ke-48 tergolong endopeptidase, dimana asam amino yang dihasilkan lebih banyak dibandingkan pada ekstraselular khamir laut yang dipanen pada hari ke 7-10. Hal ini disebabkan karena ekstraselular khamir laut pada penelitian ini memotong ikatan peptida dari bagian dalam substrat ikan peperek sehingga menghasilkan asam-asam amino yang lebih banyak dengan jumlah yang lebih merata. Sedangkan pada ekstraselular khamir laut yang dipanen pada hari ke 7-10 hanya memotong ikatan peptida pada bagian ujung substrat yang mengakibatkan asam amino yang dihasilkan lebih sedikit dengan jumlah yang tidak merata sehingga tergolong eksopeptidase. Susanto dan Sopiha (2003) mengatakan bahwa eksopeptidase memutus ikatan peptida pada ujung atau dekat ujung rantai polipeptida baik pada gugus amino maupun gugus karboksilnya, sehingga akan dihasilkan asam amino dan fragmen peptida



sedangkan endopeptidase memutuskan ikatan peptida tidak pada ujung rantai polipeptida melainkan pada bagian 'dalam' sehingga akan dihasilkan sejumlah peptida dan polipeptida.

Kandungan asam amino pada penelitian ini masih jauh lebih rendah jika dibandingkan dengan kandungan asam amino pada penelitian Lian *et al* (2005) mengenai hidrolisat protein cumi-cumi. Hal ini diduga karena ekstraselular khamir laut yang dipanen pada jam ke-48 memiliki kemurnian yang masih rendah sehingga kemampuan menghidrolisis protein ikan peperek menjadi asam amino terhambat oleh kontaminan yang masih terkandung dalam ekstraselular khamir laut dan adanya inhibitor pada ekstraselular khamir laut juga diduga merupakan penyebab rendahnya aktivitas ekstraselular khamir laut dalam menghidrolisis ikan peperek. Selain itu perbedaan bahan baku juga dimungkinkan dapat menyebabkan perbedaan asam amino yang terbentuk pada masing-masing hidrolisat, dimana berdasarkan penelitian ini asam amino yang terkandung pada ikan peperek masih sangat rendah.





## 5. PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Kesimpulan dari hasil penelitian yang telah dilaksanakan adalah sebagai berikut :

- a. Karakteristik ekstraselular dari khamir laut yang dipanen pada jam ke-48 yakni memiliki konsentrasi protein sebesar 121 mg/mL; aktivitas enzim sebesar 0,2625 U/mL/menit; aktivitas spesifik enzim sebesar 2,169 U/mg;  $K_M$  sebesar  $1,4255 \times 10^3$  mM;  $V_{maks}$  sebesar 0,0719 mmol/menit/mg.
- b. Ekstraselular khamir laut yang dipanen pada jam ke-48 memiliki kondisi optimum dalam menghidrolisis protein ikan peperek selama 59 menit, pada suhu 50°C, pada pH 10, dan konsentrasi substrat sebesar 0,4%. Berat molekul hidrolisat protein ikan peperek berkisar antara 17 kDa hingga 140 kDa, dan asam amino yang terdeteksi sebanyak 15 asam amino meliputi treonin, tirosin, valin, metionin, isoleusin, leusin, fenilalanin, asam aspartat, serin, asam glutamat, glisin, histidin, arginin, alanin, dan prolin. Ekstraselular khamir laut yang dipanen pada fase log tergolong protease serin yang optimum bekerja pada pH basa dan termasuk endopeptidase.

### 5.2 Saran

Saran yang dapat diberikan dari penelitian ini adalah :

- Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pemurnian protease ekstraselular untuk memperoleh protease yang lebih murni dan meningkatkan kemampuan hidrolisis asam amino.

- Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai karakteristik protease yang meliputi aktivator, inhibitor, dan kofaktor untuk memperoleh informasi yang lebih lengkap mengenai protease yang dihasilkan.



## DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah M. F. B. 2006. The Production of Extracellular Protease Using *Bacillus subtilis* : Effect of Temperature and Agitation Speed. Thesis. Faculty of Chemical Engineering and Natural Resources. University College of Engineering and Technology. Malaysia.
- Agustini R. 2006. Pemanfaatan Protease termofil yang Hidup di Sumber Air Panas Cagar Batu Malang. Jurnal Kimia Indonesia. Vol. 6. N0.2. Hal. : 205-211.
- Ahmad R. Z. 2008. Pemanfaatan Cendawan untuk Meningkatkan Produktivitas dan Kesehatan Ternak. Jurnal Litbang Pertanian 27 (3) : 84-92.
- Akcan N., and Uyar F. 2011. Production of extracellular alkaline protease from *Bacillus subtilis* RSKK96 with solid state fermentation. EurAsian Journal of Biosciences. Vol 5. pp 64-72.
- Alarcon F. J., Ona C. D., Diaz M., Carreno F. L. G., Moyano F. J., and Toro M. A. N. D. 2007. The Effect of Proteinase Inhibitors in Food Protein Hydrolysis by Digestive Proteinases of White Shrimp (*Penaeus vannamei*) Larvae. Journal of The Science of The Food and Agriculture. Vol. 87 : 120-126.
- Anam K. 2010. Kinetika Reaksi Enzimatis. Bioteknologi Sekolah Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Anonimous 2012. Klasifikasi Ikan Peperek (*Leiognathus* sp.). [http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=168799&search\\_kingdom=every&search\\_span=exactly\\_for&categories=All&source=html&search\\_credRating=All](http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=168799&search_kingdom=every&search_span=exactly_for&categories=All&source=html&search_credRating=All). Diakses tanggal 18 Juli 2012 pukul 11.26 WIB.
- Apriani L. 2008. Seleksi Bakteri Penghasil Enzim Kitinolitik serta Pengujian Beberapa Variasi Suhu dan pH untuk Produksi Enzim. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia. Jakarta.
- Arief R. W. dan Asnawi R. 2009. Kandungan Gizi dan Komposisi Asam Amino Beberapa Varietas Jagung. Jurnal Penelitian Terapan Vol. 9. No. 2. Hal. : 61-66.
- Ariyani F., Saleh M., Tazwir, dan Hak N. 2003. Optimasi Proses Produksi Hidrolisat Protein Ikan (HPI) dari Mujair (*Oreochromis Mossambicus*). Jurnal Penelitian Perikanan Vol. 9. No. 5. Hal : 11-21.
- Aulanni'am. 2005. Protein dan Analisisnya. Citra Mentari Group. Malang



- Awwalurrizki N., dan Putra S. R. 2008. Hidrolisis Sukrosa Dengan Enzim Invertase untuk Produksi Etanol menggunakan *Zymomonas Mobilis*. Prosiding Skripsi. Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Teknologi Sepuluh November. Surabaya.
- Baehaki A., Suhartono M. T., Palupi N. S., dan Nurhayati T. 2008. Purifikasi dan Karakterisasi Protease dari Bakteri Patogen *Pseudomonas aeruginosa*. Jurnal Teknologi dan Industri Pangan. Vol 19. No. 1 : 80-87.
- 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.
- Bergmeyer H. U. And Grass M. 1983. Methods of Enzymatic Analysis. Vol. 2. Weinheim : Verlag Chemie. Pp. 1007-1009.
- Bhat J. V., and Kachwalla N. 1954. Marine Yeast of The Indian Coast. Microbiology Department. St Xavier's College Bombay. India. pp 9-15.
- Burgaud G., Arzur D., Durand L., Anne M., Bonavitaz C., and Barbier G. 2010. Marine Culturable Yeasts in Deep-sea Hydrothermal Vents : Species Richness and Association with Fauna. FEMS Microbiol Ecol. Vol. 73, Pp. 121-133.
- Bykov, V. P. 1986. Marine Fishes. Chemical Composition and Processing Properties. AA. Balkema. Rotterdam.
- Campbell W. H. 1996. Basic Biochemical Technique. Spinger Verleg. New York. Pp. 69-75.
- Chi Z., C. Ma., Wang P., and Li H. F. 2007. Optimization of Medium and Cultivation Conditions for Alkaline Protease Production by The Marine Yeast *Aureobasidium pullulans*. Journal of Bioresource Technology. Volume 98.
- Chi Z., Zhang T., Liu G., Li J., and Wang X. 2009. Production, Characterization and Gene Cloning of the Extracellular Enzymes From the Marine-Derived Yeasts and Their Potential Applications. Biotechnology Advances Vol. 27, Pp. 236-255.
- Codd E. E., McAllister T. W., and Walker R. F. 1988. Factors Affecting Serotonin Uptake in to Human Platelets. Journal of Psychopharmacology Vol. 95. Issue 2. pp 180-184.
- Cox R. A. 2003. Correlation of The Rate of Protein Synthesis and The Third Power of The RNA : Protein Ratio in *Escherichia coli* and *Mycobacterium tuberculosis*. Microbiology Vol. 149. pp. 729-737.
- Deutscher M. P. 1990. Methods in Enzymology, vol. 182. Guide to Protein Purification, Academic press. Inc. San Diego, pp. 285-289.

- Dewi W. K. 2006. Pemurnian dan Pencirian Protease dari Isolat Bakteri W-1 yang Dihasilkan oleh Tauco Hitam. Skripsi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor. Bogor. 37 halaman.
- Dynnar N. 2011. Pemurnian dan Karakterisasi Enzim Katepsin dari Ikan Bandeng (*Chanos chanos* Forskall). Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 53 halaman.
- Ekantari N., Santoso U., dan Hadiwiyoto S. 2005. Optimasi Pembuatan Hidrolisat Protein dari Daging Cucut (*Carcharinus* sp.) Menggunakan Viscera dan Tripsin. *Agrosains* Vol.18, No.3, Hal. 327-341.
- Ernawati. 2010. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat pada Susu Kambing Segar. Skripsi. Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Malang. 99 halaman.
- Faatih M. 2009. Isolasi dan Digesti DNA Kromosom. *Jurnal Penelitian Sains dan Teknologi*. Vol. 10. No. 1. Hal. : 61-67.
- Fatmawati U., Suranto, dan Sajidan. 2010. Ekspresi Protein pada Mikroorganisme Resisten Logam Berat Cr dengan Metode Elektroforesis. Universitas Negeri Semarang. Semarang.
- Febriani M. 2008. Penggunaan Khamir Laut Sebagai Biokatalisator dalam Pembuatan Silase Ikan Peperek (*Leiognathus splendens*) dan Silase Keong Mas (*Pomaceae* Sp). *Prosiding Bidang Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan. Seminar Nasional Perikanan dan Kelautan dan Konferensi Nasional. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya, Malang, 8 November 2008, hal. 5-11.*
- Gandjar, I. 2006. Mikologi Dasar dan Terapan. Yayasan Obor Indonesia. Jakarta.
- Girindra A. 1993. Biokimia. PT Gramedia. Jakarta.
- Giyatmi, Basmal J., Wijaya C. H., dan Fardiaz. 2000. Pengaruh Jenis Kapang dan Lama Fermentasi Terhadap Mutu Ikan Kayu (*Katsuobushi*) Cakalang. *Buletin Teknologi dan Industri Pangan*. Vol. XI. No. 2. Hal. : 10-20.
- Gupta R., Beg Q. K., and Lorenz P. 2002. Bacterial Alkaline Proteases : Molecular Approaches and Industrial Applications. *Mini Review of Applications Microbial Biotechnology* 59 : 15-32.
- Hadiwiyoto. 1993. Teknologi Pengolahan Hasil Perikanan. Jilid 1. Penerbit Liberty. Yogyakarta.
- Handayani W., Ratnadewi A. A. I., dan Santoso A. B. 2007. Pengaruh Variasi Konsentrasi Sodium Klorida Terhadap Hidrolisis Protein Ikan Lemuru (*Sardinella lemuru* Bleeker, 1853) oleh Protease Ekstrak Nanas (*Ananas comosus* [L.] Merr. var. *Dulcis*). *Jurnal Teknologi Proses* Vol. 6. No.1. hal : 1-9.



Hartati L., Yusiati L. M., dan Bachrudin Z. 2003. Karakterisasi Protease dan Isolat Bakteri Pendegradasi Tepung Bulu. Program Studi Ilmu Peternakan. Program Pascasarjana Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.

Haslaniza H., Maskat M. Y., Aida W., W. M., and Mamot S. 2010. The Effects of Enzyme Concentration, Temperature and Incubation Time On Nitrogen Content and Degree of Hydrolysis of Protein Precipitate from Cockle (*Anadara granosa*) Meat Wash Water. International Food Research Journal Vol. 17. pp. 147-152.

Held P. 2010. Monitoring Growth of Beer Brewing Strains of *Saccharomyces cerevisiae*. Application Note. pp. 1-10.

Hidayat T. 2005. Pembuatan Hidrolisat Protein dari Ikan Selar Kuning (*Caranx leptolepis*) dengan Menggunakan Enzim Papain. Program Studi Teknologi Hasil Perikanan dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor. Bogor.

Hoyle N. T. and Merritt J. H. 1994. Quality of fish protein hydrolysate from herring (*Clupea harengus*). Journal of Food Sciences Vol. 59. pp 76-79.

Jaspan H. B., Gaumer H. R., and Garry R. F. 2003. Journal of Negative Results in BioMedicine. No. 2. Vol. 2. pp. 1-4.

Jaziri A. A. 2010. Karakteristik Ekstrak Kasar Khamir Laut dalam Hidrolisis Protein Daging Ikan Peperek (*Leiognathus* sp.). Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya. Malang.

Judoamidjojo R. M., Darwis A. A., dan Sa'id E.G. 1992. Teknologi Fermentasi. Rajawali Press. Jakarta.

Klomklao S. 2008. Digestive Proteinases from Marine Organism and Their Application. Songklanakarin Journal of Science and Technology. Vol. 30. No. 1. Pp 37-46.

Koesoemawardi D. 2009. Kajian Hidrolisat Protein dari Ikan Rucah sebagai Bahan Fortifikasi Makanan. Seminar Hasil Penelitian & Pengabdian Kepada Masyarakat, Universitas Negeri Lampung. Bandar Lampung.

Kohlmeyer J., and Kohlmeyer E. 1979. Marine Micology : The Higher Fungi. Academic Press. New York.

Kosaric N. A., Wiczorek G. P., Cosentino R. J., Magee J., and Prenosil E. 1983. Ethanol Fermentation. pp. 257-385.

Kosim M. Dan Putra S. R. 2010. Pengaruh Suhu pada Protease dari *Bacillus subtilis*. Prosiding Skripsi Semester Genap. Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Teknologi Sepuluh November. Surabaya.



- Kottelat M., Whitten A. J., Kartikasari S. N., and Wirjoatmodjo S. 1993. Freshwater Fishes of Western Indonesia and Sulawesi. Periplus Edition (HK). Jakarta.
- Kuncoro M. 2003. Metode Riset untuk Bisnis dan Ekonomi. Erlangga. Jakarta.
- Kutty S. N. and Philip R. 2008. Marine Yeast : A Review. No. 25. pp. 465-483.
- Lehninger. 1988. Dasar-Dasar Biokimia. Jilid 1. Alih bahasa : Maggy Thenawidjaja. Erlangga. Jakarta.
- Lehninger. 1997. Dasar-dasar Biokimia. Jilid 2. Alih bahasa : Maggy Thenawidjaja. Erlangga. Jakarta.
- Lian P. Z., Lee C. M., and Park E. 2005. Characterization of Squid-Processing Byproduct Hydrolysate and Its Potential as Aquaculture Feed Ingredient. Journal of Agriculture Food Chemistry. Vol. 53. Pp. 5587-5592.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., and Randall R. J. 1951. Protein Measurement with The Folin Phenol Reagent. Journal of Biology and Chemistry. Vol. 193. pp. 265-275.
- Mackie I. M. 1994. Fish Protein. In New and Developing Sources of Food Proteins. Edited by B. J. F. Hudson. Chapman and Hall. New York.
- Maranatha B. 2008. Aktivitas Enzim Selulase Isolat Asal Indonesia pada Berbagai Substrat Limbah Pertanian. Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Maryati K. T, Suranto, dan Sugiyarto. 2009. Karakterisasi Lundi Putih (Melolonthidae: *Coleoptera*) pada Pertanaman Salak berdasarkan Ciri Morfologi dan Pola Pita Protein. Bioteknologi. Vol. 6. No. 2. Hal : 80-87.
- McKee T., and McKee J. R. 2003. Biochemistry : The Molecular Basic of Life. Third Edition. Mc Graw Hill Companies Inc. New York. Hal. 79-84.
- Michaelis L. and Menten M. 1913. The Relationship Between Substrate Concentration and Enzyme Concentration. Biochemi Z. Vol. 49. pp. 333-369.
- Muchtadi D., Palupi S. R., dan Astawan M. 1992. Enzim dalam Industri Pangan. PAU. Pangan dan Gizi. IPB. Bogor. Hal. 55-58.
- Murni S. W., Kholisoh S. D., Tanti D. L., dan Petrissia E. M. 2011. Produksi, Karakterisasi, dan Isolasi Lipase dari *Aspergillus niger*. Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia 'Kejuangan'. Hal. : 88-94.
- Murray R. K., Granner D. K., and Rodwell V.W. 2009. Biokimia Harper Edisi 27. Alih Bahasa : Brahm U. Pendit. Buku Kedokteran EGC. Jakarta.

Naiola E., dan Widyastuti N. 2002. Semi Purifikasi dan Karakterisasi Enzim Protease *Bacillus* sp. Berk. Penelitian Hayati. Hal. 467-473.

Nannipieri P., Ascher J., Ceccherini M. T., Landi L., Pietramellara G., and Renella G. 2003. Microbial Diversity and Soil Functions. European Journal of Soil Sciences. Vol. 54. Pp. 655-670.

Nianda T. 2008. Komposisi Portein dan Asam Amino Daging Ikan Gurami (*Osphronemus gouramy*) pada Berbagai Umur Panen. Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor. Bogor. 71 halaman.

Nuraini A. D. 2002. Isolasi dan Karakterisasi Enzim Protease dari *Bacillus laterosporus*. Skripsi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang. Malang.

Nurhariyati T., Ni'matuzahiroh, dan Surtiningsih T. 2004. Keanekaragaman Khamir Pendegradasi Minyak Hasil Isolasi dari Pelabuhan Tanjung Perak Surabaya. Berk. Penelitian Hayati vol.9. hal. : 87-91.

Pakpahan R. 2009. Isolasi Bakteri dan Uji Aktivitas Protease Termofilik dari Sumber Air Panas Sipholon Tapanuli Utara Sumatera Utara. Tesis. Sekolah Pascasarjana Universitas Sumatera Utara. Medan.

Pasaribu B. 2012. Uji Kadar Protein pada Telur dengan Metode Lowry. <http://jusakben.blogspot.com/2012/04/uji-kadar-protein-pada-telur-dengan.html>. Diakses pada tanggal 03 September 2012, pukul 09.00 WIB.

Pawiroharsono S. 2008. Penerapan Enzim Untuk Penyamakan Kulit Ramah Lingkungan. Jurnal Teknologi Lingkungan. Vol. 9. No. 1. Hal. : 51-58.

Pigott G. M., and Tucker B. W. 1990. Seafood : Effect of Technology on Nutrition. Marcel Dekker, Inc. New York.

Ping W., Zhenming C., and Chunling M.A. 2006. Alkaline Protease Production by a strain of Marine Yeast. Journal of Ocean University of China. Journal of Ocean University of China (English Edition). Vol. 5. No. 3. pp. 263-268.

Pratama A. J. 2011. Hubungan antara Jumlah Sel Somatis dengan Kadar Protein dan Profil Asam Amino Susu. Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya. Malang.

Purbasari D. 2008. Produksi dan Karakterisasi Hidrolisat Protein dari Kerang Mas Ngur (*Atactodea striata*). Program Studi Teknologi Hasil Perikanan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor. Bogor.



- Purbowatiningrum R.S., Hasim, dan Iswantini D. 2004. Pengembangan Metode Penentuan Isoflavon Kadar Rendah dalam Limbah Cair Tahu Menggunakan Enzim NADH Oksidase. JKSA, Vol.VII, No.1. Hal : 18-23.
- Purwoko T. dan Handajani N. S. 2007. Kandungan Protein Kecap Manis Tanpa Fermentasi Moromi Hasil Fermentasi *Rhizopus oryzae* dan *R. Oligoporus*. Biodiversitas Vol. 8. No. 3. Hal. : 223-227.
- Puspita E. 2007. Studi Karakteristik Kitosanase dari Isolat *Bacillus licheniformis* MB-2. Skripsi. Fakultas Teknologi Pertanian Institut Pertanian Bogor. Bogor. 104 halaman.
- Putra G. P. G. 2009. Penentuan Kinetika Enzim Poligalakturonase (PG) Endogenous dari Pulp Biji Kakao. Jurnal Biologi Vol. 12. No. 1. Hal. : 21-24.
- Rahayu K. 1991. Isolasi dan Pengujian Aktivitas Enzim. PAU Pangan dan Gizi. UGM Press. Yogyakarta.
- Rahim D. A. R. 2009. Produksi Etanol oleh *Saccharomyces cerevisiae* Var. Ellipsoideus dari Sirup Dekstrin Pati Sagu (*Metroxylon* Sp.) Menggunakan Metode Aerasi Penuh dan Aerasi Dihentikan. Fakultas Teknologi Pertanian Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Rejeki D. S., Asy'ari M., dan Wuryanti. 2009. Pengaruh Ion  $Zn^{2+}$  Terhadap Aktivitas Protease Ekstraselular Bakteri halofilik Isolat *Bittern* Tambak Garam Madura. Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Diponegoro. Semarang.
- Schomburg D.S., and Salzman M. 1991. Enzyme Handbook 4. Class 3 : Hydrolases. Springer. Berlin.
- Sediaoetama A. D. 2006. Ilmu Gizi. Dian Rakyat. Jakarta.
- Shamloo M., Bakar J., Hashim M., and Khatib A. 2012. Biochemical Properties of Red Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Protein Hydrolysates. International Food Research Journal. Vol. 19. No. 1. pp. 183-188.
- Souissi N., Bougatef A., Ellouz Y. T., and Nasri M. 2007. Biochemical and Functional Properties of Sardinella (*Sardinella aurita*) By-Product Hydrolysates. Vol. 45. No. 2. pp. 187-194.
- Suhartono M. T. 2000. Pemahaman Karakteristik Biokimiawi Enzim protease dalam Mendukung Industri Berbasis Bioteknologi. Orasi Ilmiah. Guru Besar Tetap Ilmu Dasar-Dasar Biokimia Pangan. Fakultas Teknologi Pertanian Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Suhartono. 1989. Enzim dan Bioteknologi. PAU Bioteknologi. IPB. Bogor. Hal. 147-150.



- Susanti, E. 2002. Isolasi dan Karakterisasi Protease dari *Bacillus subtilis* 1012M15. Biodiversitas. Volume 4. Nomor 1.
- Susanto J. P. dan Sopiha N. 2003. Pengaruh Logam dan Konsentrasi Substrat Terhadap Pertumbuhan dan Aktivitas Bakteri Proteolitik pada Proses Deproteinasi Cangkang Rajungan. Jurnal Teknologi Lingkungan No. 4. Vol. 1. Hal. : 40-45.
- Sutandi C. 2003. Analisis Potensi Enzim Protease Lokal. Skripsi. Fakultas Teknologi Pertanian Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Syafii I. 2011. Karakterisasi Dialisat Ekstraselular Khamir Laut dengan Berat Molekul  $\geq 25$  kDa yang Didialisis pada pH 8 dan Aplikasinya dalam Pembuatan Hidrolisat Protein Ikan Peperek (*Leiognathus* sp.). Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya. Malang.
- Umar H. 1999. Metode Penelitian untuk Skripsi dan Tesis Bisnis. PT. Raja Grafindo Persada. Jakarta.
- Urano N., Yamazaki M., and Ueno R. 2001. Distribution of Halotolerant and/or Fermentative Yeasts in Aquatic Environments. Journal of Tokyo University of Fisheries. Vol. 87. pp. 23-29.
- Wijayanti A. T. 2009. Kajian Penyaringan dan lama Penyimpanan dalam Pembuatan *Fish Peptone* dari Ikan Selar Kuning (*Caranx leptolepis*). Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor. Bogor. 103 halaman.
- Wirajana I. N. dan Puspaningsih N. N. T. 2011. Fraksinasi Amonium Sulfat pada Enzim  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase Termotabil. Jurnal Kimia. No. 5. Vol. 2. Hal. : 175-181.
- Wiranadikusumah M. 1989. Protein, Enzim, dan Asam Nukleat. Institut Teknologi Bandung. Bandung. Hal : 60-62.
- Wood, B. J. B.. 1998. Microbiology of Fermented Food. Blackie Academic and Professional Chapman Hall. New York.
- Yuanita L. 2006. Okidasi Asam lemak Daging Sapi dan Ikan pada Penggunaan Natrium Tripolifosfat : Pemasakan dan Penyimpanan. Jurnal Ilmu Dasar. Vol. 7. No. 2. Hal. : 194-200.
- Yuanita L., Puspita A., Surodjo S., Hidayati S., Amin F. A., dan Budiman A. 2010. Isolasi, Pemurnian dan Karakterisasi Fitase *Bacillus subtilis* dari Holiwood Gresik. Berk. Penelitian Hayati. Vol. 15. Hal. : 113-119.
- Zayas J. F. 1997. Functionality of Protein in Food. Germany. Springer.

Lampiran 1. Perhitungan Konsentrasi Protein Ekstraselular Khamir Laut yang Dipanen pada Jam ke-48

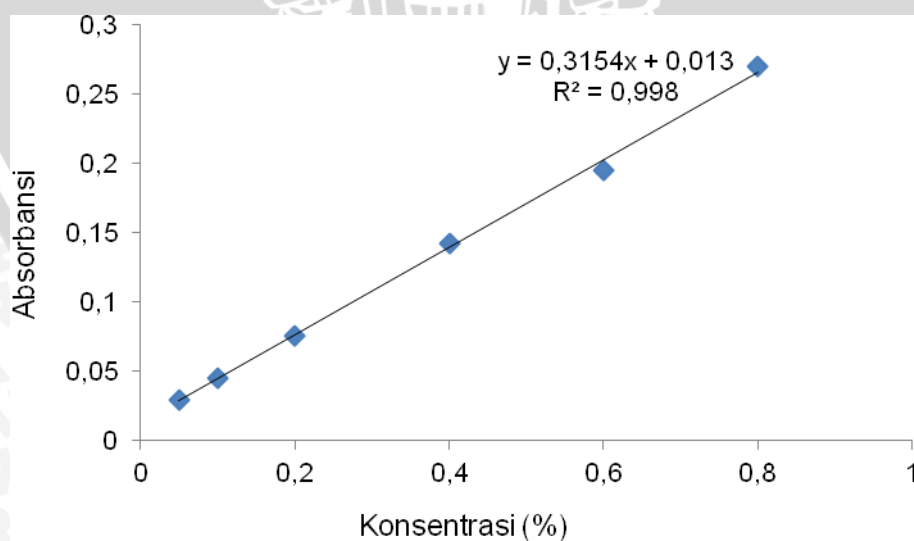
Hasil pembacaan absorbansi ekstraselular khamir laut pada spektrofotometer

Sampel	Absorbansi
Ekstraselular khamir laut	0,051

Hasil pembacaan absorbansi standar BSA pada spektrofotometer

Konsentrasi standar BSA	Absorbansi
0,05	0,029
0,1	0,045
0,2	0,0755
0,4	0,1425
0,6	0,1945
0,8	0,2695

Untuk menentukan konsentrasi protein dari standar BSA maka dibuat grafik standar BSA menggunakan *Microsoft Excel 2007* dengan konsentrasi standar BSA sebagai sumbu x dan absorbansi sebagai sumbu y. Grafik standar BSA dapat dilihat pada gambar dibawah.



Perhitungan konsentrasi protein ekstraselular khamir laut berdasarkan grafik di atas yakni :

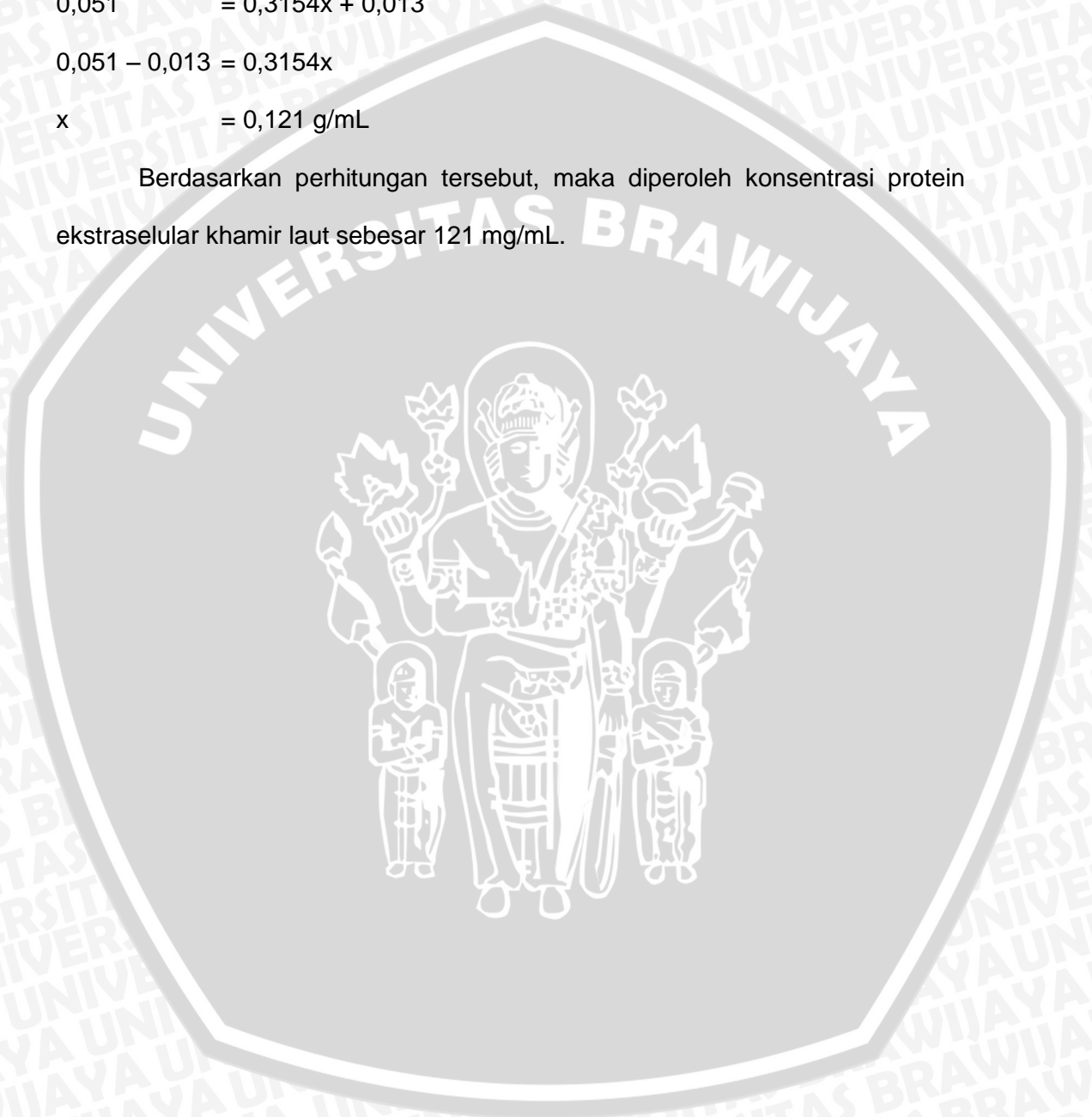
$$y = 0,3154x + 0,013$$

$$0,051 = 0,3154x + 0,013$$

$$0,051 - 0,013 = 0,3154x$$

$$x = 0,121 \text{ g/mL}$$

Berdasarkan perhitungan tersebut, maka diperoleh konsentrasi protein ekstraselular khamir laut sebesar 121 mg/mL.





Lampiran 2. Perhitungan Aktivitas Ekstraselular Khamir Laut yang Dipanen pada Jam ke-48

Aktivitas ekstraselular khamir laut dapat dihitung berdasarkan rumus berikut yakni :

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

Hasil pembacaan absorbansi ekstraselular khamir laut, standar, dan blanko yakni :

Sampel	Absorbansi
Ekstraselular khamir laut	0,017
Standar	0,018
Blanko	0,013

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

$$U = \frac{0,017 - 0,013}{0,018 - 0,013} \times 8 \times \frac{1}{30}$$

$$U = 0,2112 \text{ U/mL/menit}$$

$$U = 211,2 \text{ mU/mL/menit}$$

Aktivitas spesifik ekstraselular khamir laut dapat dihitung berdasarkan rumus berikut :

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

$$= \frac{0,2112}{0,121}$$

$$= 1,745 \text{ U/mg}$$

$$= 1.745 \text{ mU/mg}$$

Jadi aktivitas ekstraselular khamir laut tiap 1 mL adalah sebesar 211,2 mU per menit dan aktivitas spesifik ekstraselular khamir laut tiap 1 mg adalah sebesar 1.745 mU/mg.

Lampiran 3. Perhitungan Kinetika Ekstraselular Khamir Laut yang Dipanen  
pada Jam ke-48

Hasil pembacaan absorbansi dari perbandingan ekstraselular khamir laut  
: substrat ikan peperek yaitu :

Konsentrasi (%)	Absorbansi
0,5	2,872
0,25	1,884
0,16	1,653
0,125	0,844
0,1	0,684
0	0

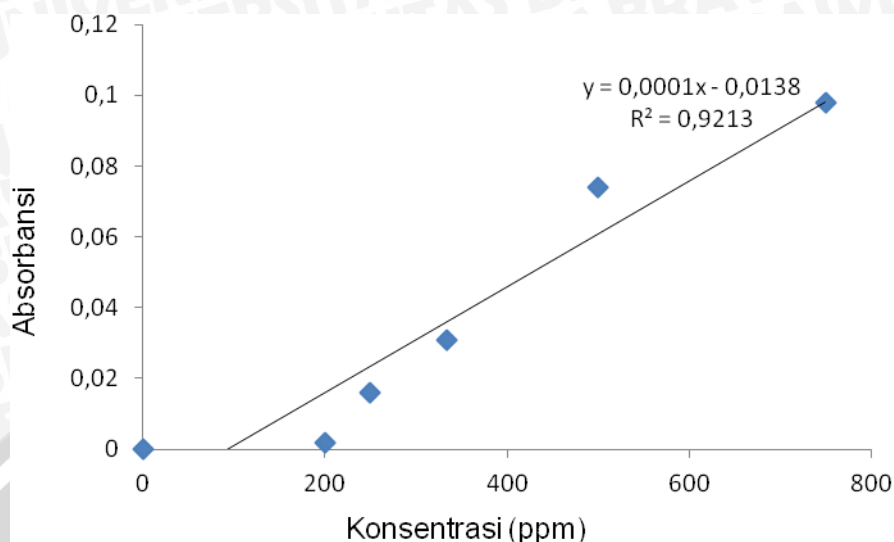
**Perhitungan Kecepatan Maksimum ( $V_{maks}$ )**

Nilai  $V_{maks}$  dapat diketahui dengan menghitung terlebih dahulu konsentrasi masing-masing hidrolisat berdasarkan persamaan regresi linear kurva standar tirosin yang menggunakan reagen *follin-phenol ciocalteau*.

Standar tirosin yang digunakan yakni

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
0	0
200	0,002
250	0,016
333,4	0,031
500	0,074
750	0,098

Standar tirosin tersebut diaplikasikan dalam kurva regresi linear, dimana konsentrasi sebagai sumbu x dan absorbansi sebagai sumbu y.



Konsentrasi (%)	Absorbansi (y)	$x = \{(y+0,0138)/0,0001\}$	Konsentrasi (ppm)
0,5	2,872	$x = \{(2,872+0,0138)/0,0001\}$	28858
0,25	1,884	$x = \{(1,884+0,0138)/0,0001\}$	18978
0,16	1,653	$x = \{(1,653+0,0138)/0,0001\}$	16668
0,125	0,844	$x = \{(0,844+0,0138)/0,0001\}$	8578
0,1	0,684	$x = \{(0,684+0,0138)/0,0001\}$	6978

Kecepatan reaksi (V) pada hidrolisis dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut :

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

Konsentrasi Substrat (%)	Konsentrasi Protein (ppm)	mol (gr/Mr*)	V = mol/menit**/L	1/V
0,5	28858	0,159	0,00795	125,7861635
0,25	18978	0,105	0,00525	190,4761905
0,16	16668	0,092	0,0046	217,3913043
0,125	8578	0,047	0,00235	425,5319149
0,1	6978	0,038	0,0019	526,3157895

\*Mr tirosin = 181.19

\*\*Waktu saat inkubasi 20 menit



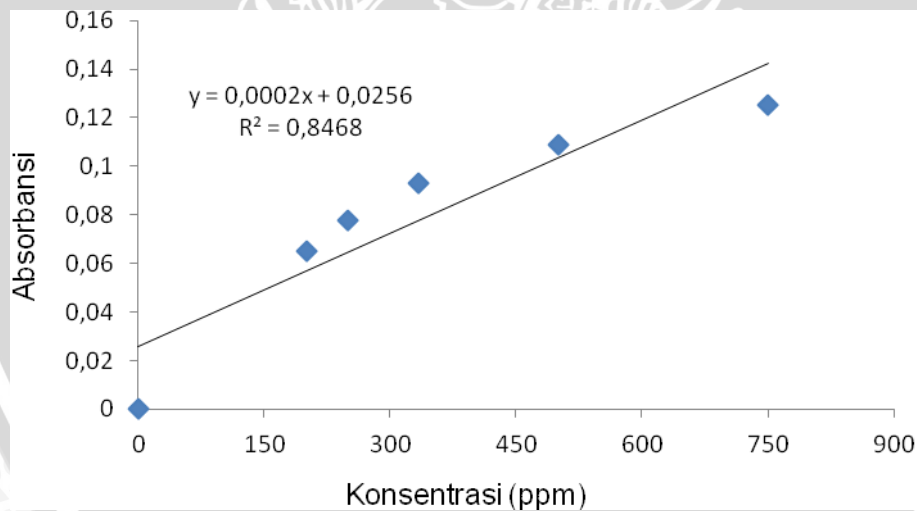
## Perhitungan Konsentrasi Substrat (S)

Konsentrasi substrat dapat diketahui dengan menghitung konsentrasi masing-masing hidrolisat terlebih dahulu menggunakan persamaan regresi linear kurva standar BSA yang menggunakan reagen biuret.

Standar BSA yang digunakan yaitu :

Konsentrasi Substrat (ppm)	Absorbansi
0	0
200	0,065
250	0,078
333,4	0,093
500	0,109
750	0,125

Standar BSA tersebut diaplikasikan dalam kurva regresi linear, dimana konsentrasi sebagai sumbu x dan absorbansi sebagai sumbu y.



Konsentrasi (%)	Absorbansi (y)	$x = \{(y-0,0256)/0,0002\}$	Konsentrasi Protein (ppm)
0,5	0,465	$x = \{(0,465-0,0256)/0,0002\}$	2197
0,25	0,317	$x = \{(0,317-0,0256)/0,0002\}$	1457
0,16	0,254	$x = \{(0,254-0,0256)/0,0002\}$	1142
0,125	0,21	$x = \{(0,21-0,0256)/0,0002\}$	922
0,1	0,173	$x = \{(0,173-0,0256)/0,0002\}$	737

Konsentrasi substrat (S) pada hidrolisis dapat dihitung dengan rumus

sebagai berikut :

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

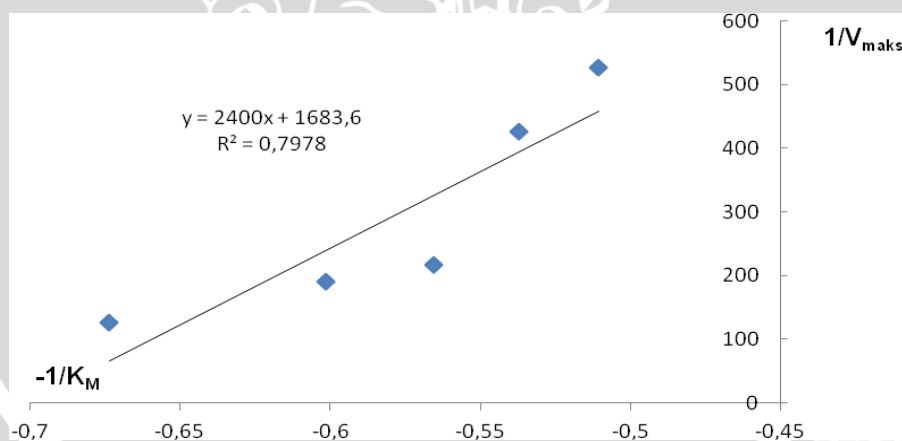
Konsentrasi (%)	Konsentrasi Protein (ppm)	S = mol/menit*/L	Log [S]	1/Log [S]
0,5	2197	0,032791045	-1,484244746	-0,673743332
0,25	1457	0,021746269	-1,662615251	-0,601462064
0,16	1142	0,017044776	-1,768408699	-0,565480141
0,125	922	0,013761194	-1,861343882	-0,537246239
0,1	737	0,011	-1,958607315	-0,510566867

\*Waktu inkubasi yakni 30 menit

Mr BSA = 67000

### Pembuatan kurva Lineweaver-Burk

Kurva Lineweaver-Burk menyatakan hubungan antara perubahan konsentrasi  $1/[S]$  sebagai sumbu x dan kecepatan reaksi ( $1/V$ ) sebagai sumbu y yang akan menghasilkan sebuah persamaan untuk memperoleh nilai konstanta Michaelis-Menten ( $K_M$ ) dan kecepatan maksimum ( $v_{maks}$ ). Kurva ini dibuat menggunakan *Microsoft Excel 2007*.



Berdasarkan persamaan diatas dapat diperoleh nilai  $K_M$  dan  $V_{maks}$  sebagai

berikut :

Untuk mencari nilai  $K_M$ , maka  $y$  dijadikan 0.

$$y = 2400x + 1683,6$$

$$0 = 2400 \cdot (-1/K_M) + 1683,6$$

$$2400/K_M = 1683,6$$

$$K_M = 1,42551675 \text{ M}$$

Untuk mencari nilai  $V_{maks}$  dapat digunakan rumus berikut :

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

Rumus tersebut menggunakan persamaan dari kurva Lineweaver-Burk yang diperoleh yakni :  $y = 2400x + 1683,6$ . Persamaan regresi pada kinetika enzim memiliki pola sebagai berikut :  $y = a + bx$ . Sehingga nilai  $V_{maks}$  pun dapat dicari.

$$y = a + bx, \text{ maka } a = 1683,6; b = 2400$$

$$b = \frac{K_M}{V_{maks}}$$

$$V_{maks} = \frac{1,42551675}{2400}$$

$$V_{maks} = 5,939653125 \times 10^{-4} \text{ mol/Liter/menit}$$

$$V_{maks} = 0,0594 \text{ mmol/Liter/menit}$$



Lampiran 4. Perhitungan Derajat Hidrolisis Ekstraselular Khamir Laut Terhadap Hidrolisat Protein Ikan Peperek (*Leiognathus* sp.)

a. Perlakuan Waktu

Derajat hidrolisis ekstraselular khamir laut terhadap hidrolisat protein ikan peperek (*Leiognathus* sp.) berdasarkan optimasi waktu dapat dilihat pada tabel dibawah ini :

Waktu (menit)	% N Total	% N Terlarut	%DH	%DH Optimum
0	0,738	0,460	62,33062	0
25	0,810	0,609	75,18519	20,6231884
50	1,242	1,037	76,39405	33,9540013
75	1,076	0,822	76,39405	22,5626313
100	0,967	0,713	73,7332	18,2936918

Untuk mencari waktu optimum, maka diasumsikan pada waktu ke-0, %DH adalah 0. Perhitungan %DH dan %DH optimum dapat dilihat dibawah ini :

- Perhitungan %DH dan %DH kondisi optimum pada menit ke-0 :

$$\%DH = \frac{N \text{ Terlarut}}{N \text{ Total}} \times 100\% = \frac{0,460}{0,738} \times 100\% = 62,33062$$

$$\%DH \text{ optimum} = \frac{(62,33062 - 62,33062)}{62,33062} \times 100\% = 0$$

- Perhitungan %DH dan %DH kondisi optimum pada menit ke-25 :

$$\%DH = \frac{N \text{ Terlarut}}{N \text{ Total}} \times 100\% = \frac{0,609}{0,810} \times 100\% = 75,18519$$

$$\%DH \text{ optimum} = \frac{(75,18519 - 62,33062)}{62,33062} \times 100\% = 20,6231884$$

- Perhitungan %DH dan %DH kondisi optimum pada menit ke-50 :

$$\%DH = \frac{N \text{ Terlarut}}{N \text{ Total}} \times 100\% = \frac{1,037}{1,242} \times 100\% = 83,49436$$

$$\%DH \text{ optimum} = \frac{(76,39405 - 62,33062)}{62,33062} \times 100\% = 33,9540013$$

- Perhitungan %DH dan %DH kondisi optimum pada menit ke-75 :

$$\%DH = \frac{N \text{ Terlarut}}{N \text{ Total}} \times 100\% = \frac{0,822}{1,076} \times 100\% = 76,39405$$

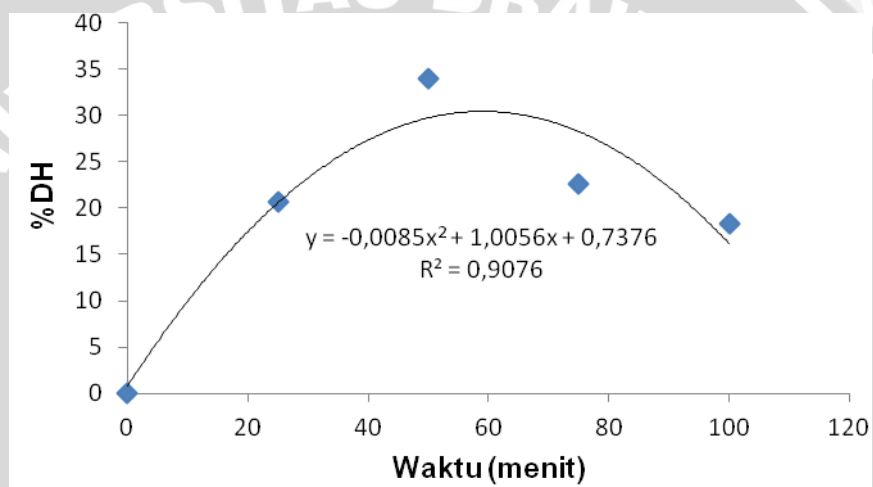
$$\%DH \text{ optimum} = \frac{(76,39405 - 62,33062)}{62,33062} \times 100\% = 22,5626313$$

- Perhitungan %DH dan %DH kondisi optimum pada menit ke-75 :

$$\%DH = \frac{N \text{ Terlarut}}{N \text{ Total}} \times 100\% = \frac{0,822}{1,076} \times 100\% = 76,39405$$

$$\%DH \text{ optimum} = \frac{(76,39405 - 62,33062)}{62,33062} \times 100\% = 18,2936918$$

Berdasarkan perhitungan tersebut, dibuat kurva regresi polinomial yang menyatakan hubungan antara waktu hidrolisis (sumbu X) dan %DH (sumbu Y).



Waktu optimum dapat dihitung berdasarkan persamaan pada gambar di atas yakni :

$$y = -0,0085x^2 + 1,0056x + 0,7376$$

Karena mencari waktu optimum, maka sumbu  $y = 0$

$$0 = -0,0085x^2 + 1,0056x + 0,7376$$

$$0 = -0,017x + 1,0056$$

$$x = 59,153 \text{ dibulatkan menjadi } 59 \text{ menit}$$

Nilai x tersebut dimasukkan dalam persamaan yang ada pada kurva di atas untuk memperoleh nilai y sebagai derajat hidrolisisnya.

$$y = -0,0085x^2 + 1,0056x + 0,7376$$

$$y = -0,0085.(50)^2 + 1,0056.(50) + 0,7376$$

$$y = 30,46\%$$

#### b. Perlakuan Suhu

Derajat hidrolisis ekstraselular khamir laut terhadap hidrolisat protein ikan peperek (*Leiognathus* sp.) berdasarkan optimasi suhu dapat dilihat pada tabel dibawah ini :

Suhu (°C)	% N Total	% N Terlarut	%DH	%DH Optimum
35	1,015	0,469	46,237	0
40	1,117	0,573	51,298	8,487
45	1,121	0,816	61,524	33,062
50	1,127	1,031	91,449	35,099
55	1,031	0,638	61,843	30,451

Untuk mencari suhu optimum, maka diasumsikan pada waktu ke-0, %DH adalah 0. Perhitungan %DH dan %DH optimum dapat dilihat dibawah ini :

- Perhitungan %DH dan %DH kondisi optimum pada suhu 35°C :

$$\%DH = \frac{N \text{ Terlarut}}{N \text{ Total}} \times 100\% = \frac{0,469}{1,015} \times 100\% = 46,23705$$

$$\%DH \text{ optimum} = \frac{(46,23705 - 46,23705)}{46,237} \times 100\% = 0$$

- Perhitungan %DH dan %DH kondisi optimum pada suhu 40°C :

$$\%DH = \frac{N \text{ Terlarut}}{N \text{ Total}} \times 100\% = \frac{0,573}{1,117} \times 100\% = 51,29795$$

$$\%DH \text{ optimum} = \frac{(51,29795 - 46,23705)}{46,23705} \times 100\% = 8,487$$

- Perhitungan %DH dan %DH kondisi optimum pada suhu 45°C :

$$\%DH = \frac{N \text{ Terlarut}}{N \text{ Total}} \times 100\% = \frac{0,689}{1,121} \times 100\% = 61,523941$$



$$\%DH \text{ optimum} = \frac{(61,523941 - 46,23705)}{46,23705} \times 100\% = 33,062$$

- Perhitungan %DH dan %DH kondisi optimum pada suhu 50°C :

$$\%DH = \frac{N \text{ Terlarut}}{N \text{ Total}} \times 100\% = \frac{1,031}{1,127} \times 100\% = 91,44873$$

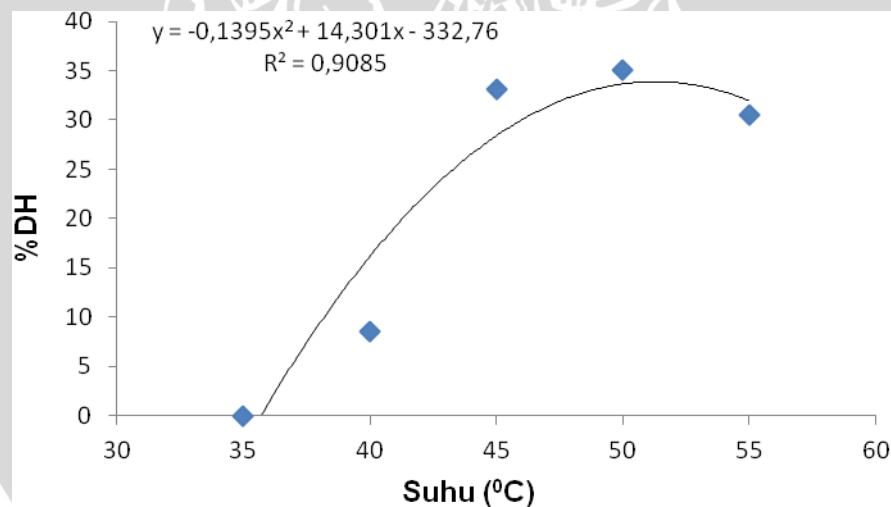
$$\%DH \text{ optimum} = \frac{(91,44873 - 46,23705)}{46,23705} \times 100\% = 35,099$$

- Perhitungan %DH dan %DH kondisi optimum pada suhu 55°C :

$$\%DH = \frac{N \text{ Terlarut}}{N \text{ Total}} \times 100\% = \frac{0,638}{1,031} \times 100\% = 61,84267$$

$$\%DH \text{ optimum} = \frac{(61,84267 - 46,23705)}{46,23705} \times 100\% = 30,451$$

Berdasarkan perhitungan tersebut, dibuat kurva regresi polinomial yang menyatakan hubungan antara suhu pada saat hidrolisis (sumbu X) dan %DH (sumbu Y).



Suhu optimum dapat dihitung berdasarkan persamaan pada gambar di atas yakni :

$$y = -0,1395x^2 + 14,301x + 332,76$$

Karena mencari suhu optimum, maka sumbu y = 0.

$$0 = -0,1395x^2 + 14,301x + 332,76$$

$$0 = -0,279x + 14,301$$

$$x = 50,258 \text{ dibulatkan menjadi } 50^{\circ}\text{C}$$

Nilai x tersebut dimasukkan dalam persamaan yang ada pada kurva di atas untuk memperoleh nilai y sebagai derajat hidrolisisnya.

$$y = -0,0085x^2 + 1,0056x + 0,7376$$

$$y = -0,0085.(50)^2 + 1,0056.(50) + 0,7376$$

$$y = 30,46\%$$

**c. Perlakuan pH**

Derajat hidrolisis ekstraselular khamir laut terhadap hidrolisat protein ikan peperek (*Leiognathus* sp.) berdasarkan optimasi suhu dapat dilihat pada tabel dibawah ini :

pH	% N Total	% N Terlarut	%DH	%DH Optimum
8	0,854	0,534	62,529	0
9	0,904	0,638	70,633	12,961
10	1,321	1,069	80,923	29,417
11	1,197	0,925	77,289	23,605
12	0,931	0,657	70,592	12,895

Untuk mencari suhu optimum, maka diasumsikan pada waktu ke-0, %DH adalah 0. Perhitungan %DH dan %DH optimum dapat dilihat dibawah ini :

- Perhitungan %DH dan %DH kondisi optimum pada pH 8 :

$$\%DH = \frac{N \text{ Terlarut}}{N \text{ Total}} \times 100\% = \frac{0,534}{0,854} \times 100\% = 62,52927$$

$$\%DH \text{ optimum} = \frac{(62,52927 - 62,52927)}{62,52927} \times 100\% = 0$$

- Perhitungan %DH dan %DH kondisi optimum pada pH 9 :

$$\%DH = \frac{N \text{ Terlarut}}{N \text{ Total}} \times 100\% = \frac{0,638}{0,904} \times 100\% = 70,63345$$

$$\%DH \text{ optimum} = \frac{(70,63345 - 62,52927)}{62,52927} \times 100\% = 12,96062$$

- Perhitungan %DH dan %DH kondisi optimum pada pH 10:



$$\%DH = \frac{N \text{ Terlarut}}{N \text{ Total}} \times 100\% = \frac{1,069}{1,321} \times 100\% = 80,92354$$

$$\%DH \text{ optimum} = \frac{(80,92354 - 62,52927)}{62,52927} \times 100\% = 29,41705$$

- Perhitungan %DH dan %DH kondisi optimum pada pH 11 :

$$\%DH = \frac{N \text{ Terlarut}}{N \text{ Total}} \times 100\% = \frac{0,925}{1,197} \times 100\% = 77,28925$$

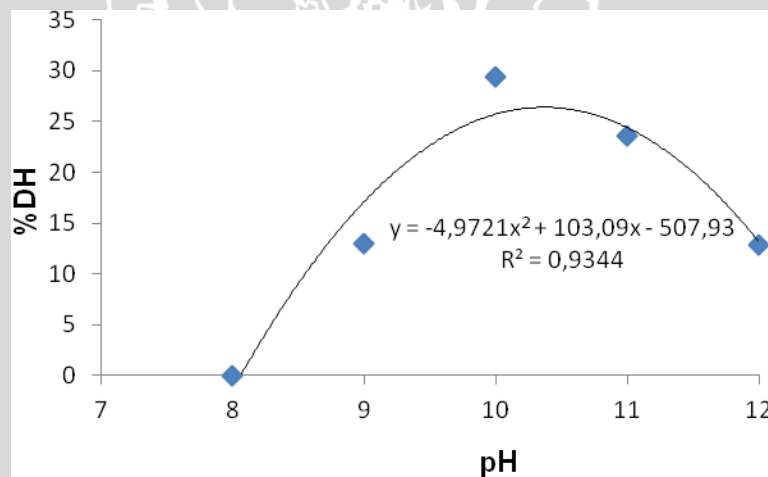
$$\%DH \text{ optimum} = \frac{(77,28925 - 62,52927)}{62,52927} \times 100\% = 23,60492$$

- Perhitungan %DH dan %DH kondisi optimum pada pH 12 :

$$\%DH = \frac{N \text{ Terlarut}}{N \text{ Total}} \times 100\% = \frac{0,657}{0,931} \times 100\% = 70,59234$$

$$\%DH \text{ optimum} = \frac{(70,59234 - 62,52927)}{62,52927} \times 100\% = 12,89488$$

Berdasarkan perhitungan tersebut, dibuat kurva regresi polinomial yang menyatakan hubungan antara pH pada saat hidrolisis (sumbu X) dan %DH (sumbu Y).



pH optimum dapat dihitung berdasarkan persamaan pada gambar di atas

$$y = -4,9721x^2 + 103,09x - 507,93$$

Karena mencari suhu optimum, maka sumbu y = 0.

$$0 = -4,9721x^2 + 103,09x - 507,93$$



$$0 = -9,9442x + 103,09$$

$$x = 10,36 \text{ dibulatkan menjadi } 10$$

Nilai x tersebut dimasukkan dalam persamaan yang ada pada kurva di atas untuk memperoleh nilai y sebagai derajat hidrolisisnya.

$$y = -4,9721x^2 + 103,09x - 507,93$$

$$y = -4,9721.(10)^2 + 103,09.(10) - 507,93$$

$$y = 25,76\%$$

**d. Perlakuan Konsentrasi Substrat**

Derajat hidrolisis ekstraselular khamir laut terhadap hidrolisat protein ikan peperek (*Leiognathus* sp.) berdasarkan optimasi suhu dapat dilihat pada tabel dibawah ini :

Konsentrasi Substrat (%)	% N Total	% N Terlarut	%DH	%DH Optimum
0,1	2,872	0,465	16,198	0
0,125	1,884	0,317	16,826	3,923
0,16	1,653	0,254	15,366	-5,049
0,25	0,844	0,210	24,882	53,677
0,5	0,684	0,173	25,292	56,215

Untuk mencari suhu optimum, maka diasumsikan pada waktu ke-0, %DH adalah 0. Perhitungan %DH dan %DH optimum dapat dilihat dibawah ini :

- Perhitungan %DH dan %DH kondisi optimum pada konsentrasi substrat 0,1% :

$$\%DH = \frac{N \text{ Terlarut}}{N \text{ Total}} \times 100\% = \frac{0,465}{2,872} \times 100\% = 16,198$$

$$\%DH \text{ optimum} = \frac{(16,198 - 16,198)}{16,198} \times 100\% = 0$$

- Perhitungan %DH dan %DH kondisi optimum pada konsentrasi substrat 0,125% :

$$\%DH = \frac{N \text{ Terlarut}}{N \text{ Total}} \times 100\% = \frac{0,317}{1,884} \times 100\% = 16,826$$



$$\%DH \text{ optimum} = \frac{(16,826-16,198)}{16,198} \times 100\% = 3,923$$

- Perhitungan %DH dan %DH kondisi optimum pada konsentrasi substrat 0,16% :

$$\%DH = \frac{N \text{ Terlarut}}{N \text{ Total}} \times 100\% = \frac{0,254}{1,653} \times 100\% = 15,366$$

$$\%DH \text{ optimum} = \frac{(15,366-16,198)}{16,198} \times 100\% = -5,049$$

- Perhitungan %DH dan %DH kondisi optimum pada konsentrasi substrat 0,25% :

$$\%DH = \frac{N \text{ Terlarut}}{N \text{ Total}} \times 100\% = \frac{0,210}{0,844} \times 100\% = 24,882$$

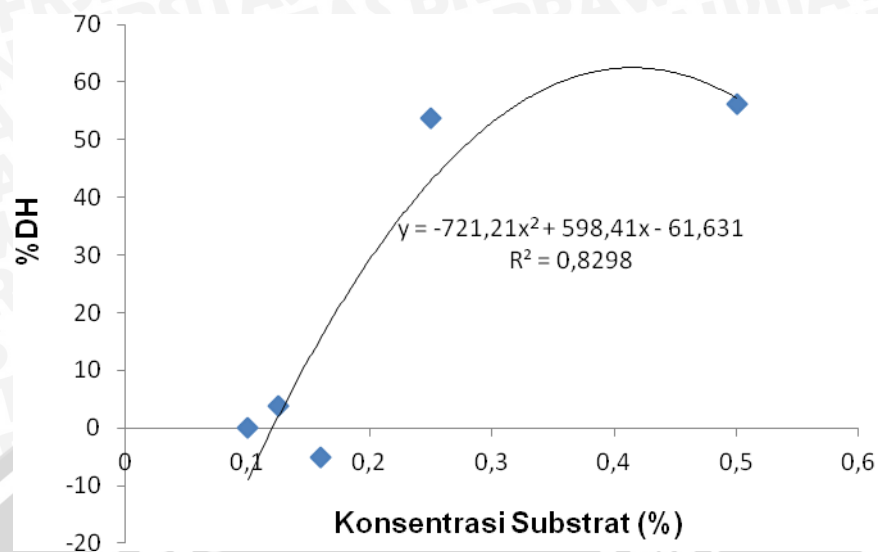
$$\%DH \text{ optimum} = \frac{(24,882 - 16,198)}{16,198} \times 100\% = 53,677$$

- Perhitungan %DH dan %DH kondisi optimum pada konsentrasi substrat 0,5% :

$$\%DH = \frac{N \text{ Terlarut}}{N \text{ Total}} \times 100\% = \frac{0,173}{0,684} \times 100\% = 25,292$$

$$\%DH \text{ optimum} = \frac{(25,292 - 16,198)}{16,198} \times 100\% = 56,215$$

Berdasarkan perhitungan tersebut, dibuat kurva regresi polinomial yang menyatakan hubungan antara konsentrasi substrat pada saat hidrolisis (sumbu X) dan %DH (sumbu Y).



Konsentrasi optimum substrat dapat dihitung berdasarkan persamaan pada gambar di atas :

$$y = -721,21x^2 + 598,41x - 61,631$$

Karena mencari suhu optimum, maka sumbu  $y = 0$ .

$$0 = -721,21x^2 + 598,41x - 61,631$$

$$0 = -1442,42x + 588,41$$

$$x = 0,41 \text{ dibulatkan menjadi } 0,4$$

Nilai  $x$  tersebut dimasukkan dalam persamaan yang ada pada kurva di atas untuk memperoleh nilai  $y$  sebagai derajat hidrolisisnya.

$$y = -721,21x^2 + 598,41x - 61,631$$

$$y = -721,21 \cdot (0,4)^2 + 598,41 \cdot (0,4) - 61,631$$

$$y = 62,34\%$$



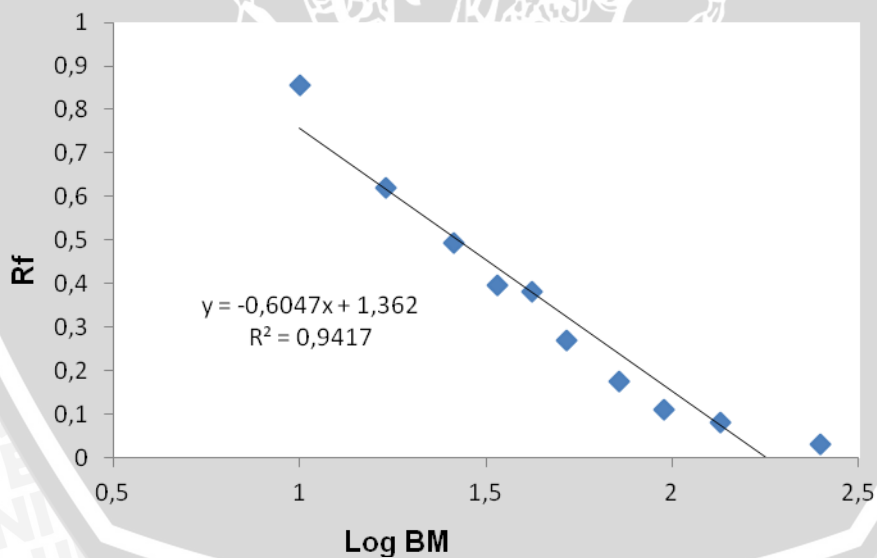
**Lampiran 5. Perhitungan Berat Molekul Hidrolisat Protein Ikan Peperek  
(*Leiognathus sp.*)**

Berat molekul marker dapat dilihat pada tabel dibawah ini :

BM (kDa)	Jarak Tracking	Log BM	Rf
250	2	2,397940009	0,031746032
135	5	2,130333768	0,079365079
95	7	1,977723605	0,111111111
72	11	1,857332496	0,174603175
52	17	1,716003344	0,26984127
42	24	1,62324929	0,380952381
34	25	1,531478917	0,396825397
26	31	1,414973348	0,492063492
17	39	1,230448921	0,619047619
10	54	1	0,857142857

Keterangan : Jarak penuh tracking = 63 mm

Berdasarkan tabel di atas, dibuat kurva regresi linier berdasarkan hubungan antara Log BM sebagai sumbu X dan Rf sebagai sumbu



Y.

Berdasarkan kurva di atas, persamaan yang diperoleh digunakan untuk menentukan berat molekul dari sampel ikan peperek dan hidrolisat protein ikan peperek.

$$y = -0,6047x + 1,362$$

$$x = (y-1,362)/-0,6047$$

Karena x masih merupakan log dari berat molekul, maka untuk menghilangkannya digunakan rumus antilog sehingga dapat diperoleh nilai berat molekul pada sampel. Berat molekul pada masing-masing sampel dapat dilihat pada tabel dibawah ini.

Tabel perhitungan berat molekul ikan peperek

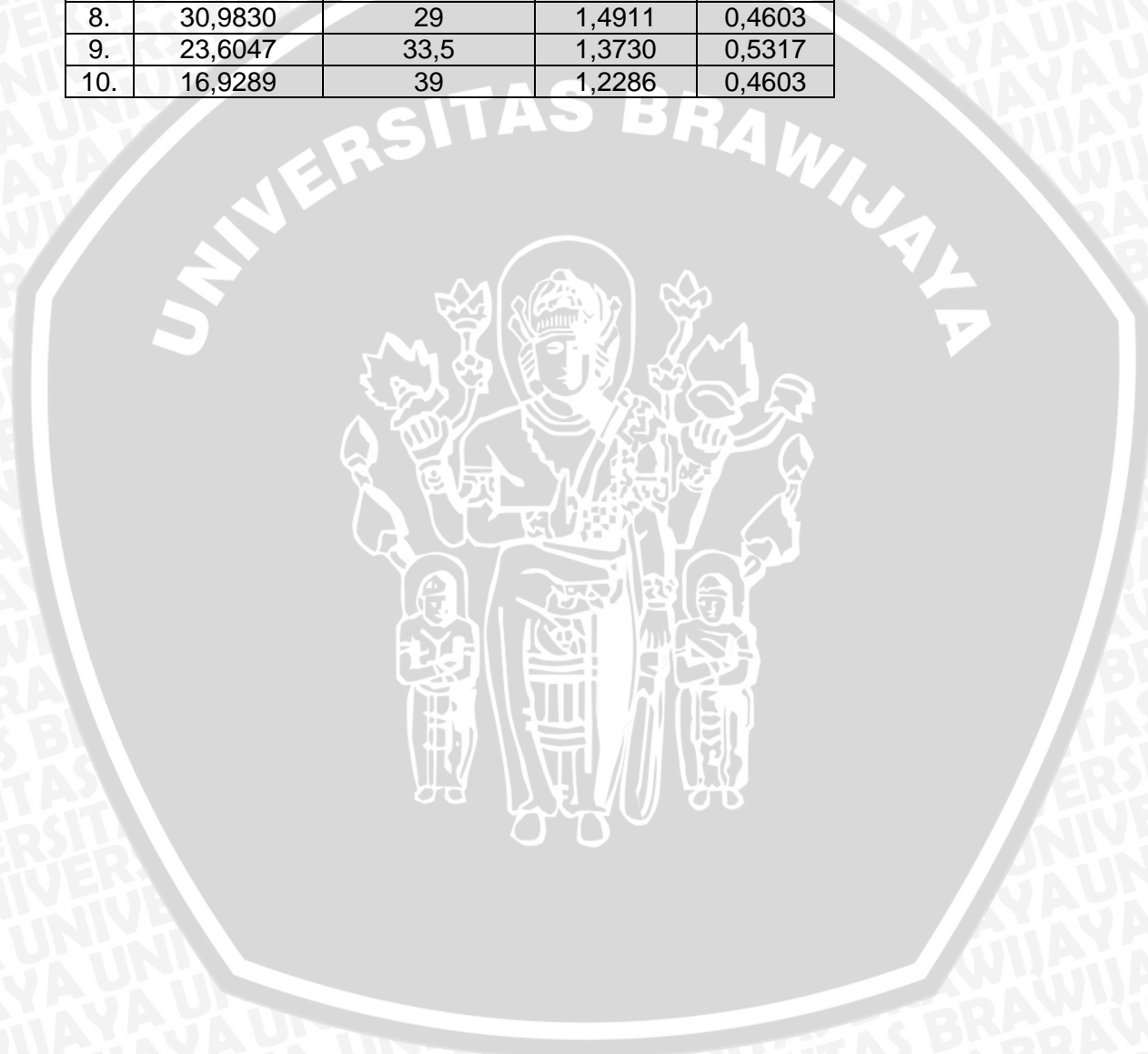
No.	BM (kDa)	Jarak Tracking	Log BM	Rf
1.	168,3089	1	2,2261	0,0159
2.	140,3973	4	2,1473	0,0635
3.	132,1628	5	2,1211	0,0794
4.	103,7796	9	2,0161	0,1429
5.	94,7846	10,5	1,9767	0,1667
6.	83,9922	12,5	1,9242	0,1984
7.	58,4443	18,5	1,7667	0,2936
8.	50,2480	21	1,7011	0,3333
9.	41,9151	24	1,6224	0,3809
10.	32,9134	28	1,5174	0,4444
11.	20,2945	36	1,3074	0,5714
12.	15,0014	41	1,1761	0,6508

Tabel perhitungan berat molekul hidrolisat protein ikan peperek dengan pengenceran

No.	BM (kDa)	Jarak Tracking	Log BM	Rf
1.	140,3973	4	2,1473	0,0635
2.	86,5692	12	1,9373	0,1905
3.	70,0633	15,5	1,8455	0,2460
4.	50,2480	21	1,7011	0,3333
5.	45,8928	22,5	1,6617	0,3571
6.	34,9641	27	1,5436	0,4286
7.	32,9134	28	1,6224	0,3809
8.	30,9830	29	1,4911	0,4603
9.	23,6047	33,5	1,3730	0,5317
10.	16,9289	39	1,2286	0,4603

Tabel perhitungan berat molekul hidrolisat protein ikan peperek tanpa pengenceran

No.	BM (kDa)	Jarak Tracking	Log BM	Rf
1.	140,3973	4	2,1473	0,0635
2.	100,6902	9,5	2,003	0,1508
3.	86,5692	12	1,9373	0,1905
4.	70,0633	15,5	1,8455	0,2460
5.	50,2480	21	1,7011	0,3333
6.	45,8928	22,5	1,6617	0,3571
7.	34,9641	27	1,5436	0,4286
8.	30,9830	29	1,4911	0,4603
9.	23,6047	33,5	1,3730	0,5317
10.	16,9289	39	1,2286	0,4603





**Lampiran 6. Penentuan Profil Asam Amino Hidrolisat Protein Ikan Peperek  
(*Leiognathus sp.*)**

Perhitungan kadar asam amino pada ikan peperek dan hidrolisat protein ikan peperek yakni sebagai berikut :

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

Tabel perhitungan kadar asam amino pada ikan peperek dan hidrolisat protein ikan peperek adalah sebagai berikut :

No.	Asam Amino	Luas area			Kadar asam amino (pmol/5µL)	
		a	b	c	d	e
1.	Asam aspartat	5705791	511181	544198	8,959	9,5376
2.	Serin	9622253	768093	3102105	7,9825	32,2389
3.	Asam glutamat	6320238	834951	495871	13,2107	7,8458
4.	Glisin	8551451	2355340	2789842	27,5431	32,6242
5.	Histidin	13261318	306500	1029299	2,3112	7,7617
6.	Arginin	11769672	837140	530177	7,1127	4,5046
7.	Treonin	11848428	562102	1005921	4,7441	8,4899
8.	Alanin	11819898	2435774	2955554	20,6074	25,0049
9.	Prolin	6102032	632843	506655	10,3710	8,3031
10.	Tirosin	13955118	188538	567728	1,3510	4,0682
11.	Valin	22303742	915730	1105182	4,1057	4,9551
12.	Metionin	19476212	176169	104352	0,9045	0,5358
13.	Isoleusin	29134876	847176	1079782	2,9078	3,6958
14.	Leusin	30783457	1839684	1683017	5,9762	5,4673
15.	Fenilalanin	42116571	953232	1636918	2,2633	3,8866

Keterangan :

a : Standar

b dan d : Sampel ikan peperek

c dan e : Sampel hidrolisat protein ikan peperek

[standar]: 100 pmol

Volume injeksi sampel dan standar : 5 µL

Untuk memperoleh kadar asam amino dalam µg/g dilakukan perhitungan

berikut :

- Misalnya untuk asam amino aspartat dalam 5 µL mengandung 8,959 pmol
- Dalam 5 µL mengandung 1192,4429 pgram
- Dalam 1 µL mengandung  $238,4886 \times 10^{-6}$  µg
- Dalam 1 mL atau 1 gram mengandung 0,2385 µg

Berdasarkan perhitungan di atas, maka kadar asam amino sampel dalam  $\mu\text{g/g}$  dapat dilihat pada tabel berikut :

No.	Asam amino	Kadar asam amino ( $\mu\text{g/g}$ )	
		a	b
1.	Asam aspartat	0,2385	0,2539
2.	Serin	0,1678	0,6776
3.	Asam glutamat	0,3887	0,2308
4.	Glisin	0,4135	0,4898
5.	Histidin	0,0717	0,2409
6.	Arginin	0,1569	0,2478
7.	Treonin	0,1130	0,2023
8.	Alanin	0,3672	0,4455
9.	Prolin	0,2387	0,1911
10.	Tirosin	0,0489	0,1474
11.	Valin	0,0962	0,1161
12.	Metionin	0,0269	0,0159
13.	Isoleusin	0,0762	0,0969
14.	Leusin	0,1567	0,1433
15.	Fenilalanin	0,0748	0,1284

Keterangan :

- a. Sampel ikan peperek  
Sampel hidrolisat protein ikan peperek

