

## 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Keong mas merupakan siput air tawar yang bukan asli Indonesia, tetapi berasal dari Amerika Selatan. Keong mas mempunyai prospek yang cukup baik untuk dikembangkan karena selain pertumbuhan yang cepat, juga memiliki kandungan nutrisi untuk menambah protein hewani dengan kandungan protein 14,04%. Sebagai salah satu diversifikasi produk untuk mengolah keong mas adalah dengan mengolahnya menjadi hidrolisat protein ikan (Hendrawati, 2011).

Hidrolisat protein merupakan protein yang mengalami degradasi hidrolitik dengan asam, basa, atau enzim proteolitik (Purbasari, 2008). Hidrolisis secara enzimatis lebih dipilih karena efisien, murah, menghasilkan hidrolisat protein ikan tanpa kehilangan asam amino esensial. Reaksi hidrolisis ini akan menghasilkan hidrolisat protein yang berkualitas karena pH, kondisi suhu, dan waktu hidrolisis yang dapat terkontrol. Penggunaan enzim dalam menghidrolisis protein dianggap paling aman dan menguntungkan karena dapat berlangsung secara spesifik sehingga dimungkinkan dapat mempengaruhi pembentukan peptida dan asam-asam amino (Nurhayati *et al.*, 2014). Pembuatan hidrolisat protein dengan menggunakan enzim mikroorganisme dapat dilakukan dengan cara fermentasi.

Fermentasi adalah proses perubahan substrat organik yang kompleks menjadi komponen yang lebih sederhana dengan adanya aktivitas enzim dan mikroba dalam keadaan terkontrol, dimana bahan-bahan atau komponen yang dihasilkan dapat menghambat kegiatan mikroba pembusuk (Sastra, 2008). Lama fermentasi yang berbeda dapat menghasilkan hasil hidrolisat yang berbeda karena dalam selang waktu tersebut terjadi penguraian senyawa kompleks menjadi sederhana. Kondisi optimum yang paling baik untuk menghasilkan hidrolisat protein pada Kerang Hijau (*Mytilus viridis*) konsentrasi enzim papain 5%, pH 6 dan

waktu hidrolisis 24 jam adalah (Purbasari, 2008). Pada proses fermentasi tentunya terdapat mikroorganisme yang berperan didalamnya. Pemilihan mikroorganisme harus disesuaikan dengan kebutuhan yang akan dihasilkan yakni pembuatan hidrolisat protein. Mikroorganisme yang akan digunakan dalam fermentasi adalah organisme yang non patogenik, tidak membutuhkan nutrisi secara spesifik, mudah untuk dikultur, dan dominan dalam pertumbuhannya, seperti khamir laut.

Khamir laut membutuhkan nutrisi untuk kebutuhan hidupnya seperti sumber karbon dan sumber nitrogen. Khamir dapat hidup dalam gula sederhana seperti glukosa, atau gula kompleks disakarida yaitu sukrosa. Khamir mempunyai reaksi positif terhadap gula rafinosa, trehalosa, maltosa, galaktosa, galaktosa, sukrosa, dan negatif pada gula laktosa (Ahmad, 2005). Sumber karbon yang biasa digunakan sebagai media pertumbuhan khamir laut adalah gula pasir. Molase banyak mengandung gula sehingga dapat digunakan sebagai energi dan sumber karbon (Febriani, 2008)

Molase merupakan hasil samping yang berasal dari pembuatan gula tebu yang berupa cairan kental dan diperoleh dari tahap pemisahan kristal gula, molase mengandung gula dengan kadar tinggi yaitu 50-60%, sehingga molase dapat digunakan sebagai media fermentasi yang baik (Juwita, 2012). Kandungan gula yang tinggi pada molase merupakan sumber karbon untuk metabolisme dan pertumbuhan mikroba, sehingga dapat ditambahkan pada proses fermentasi. Perebusan molase dilakukan, karena selain dapat mengurangi kontaminasi dari mikroba juga dapat menguraikan molase sukrosa menjadi lebih sederhana sehingga dapat langsung digunakan untuk metabolisme khamir laut (Pangesti *et al.*, 2012). Hasil penelitian pada proses pembuatan hidrolisat protein kepala udang vannamei dengan penambahan volume molase rebus terbaik yaitu 100 mL, 200 mL, dan 300 mL (Budy, 2014)

Sejauh ini belum ada penelitian mengenai khamir laut sebagai starter dalam pembuatan hidrolisat protein dari keong mas segar dengan fermentasi dan penambahan sumber karbon berupa molase rebus, maka perlu adanya penelitian mengenai hal tersebut. Dari paparan yang telah dijelaskan maka diperlukan kajian yang membahas tentang pemanfaatan khamir laut sebagai biokatalisator dalam pembuatan hidrolisat keong mas segar.

## 1.2 Rumusan Masalah

Keong mas memiliki kandungan protein yang cukup besar, namun pemanfaatan keong mas selama ini kurang optimal sehingga diperlukan adanya diversifikasi dalam pengolahan keong mas, misalnya hidrolisat protein keong mas segar. Adanya pengolahan keong mas segar menjadi hidrolisat protein dengan menggunakan fermentasi berpeluang dalam penyediaan pangan yang memiliki nilai nutrisi yang tinggi. Pemanfaatan khamir laut yang mengandung berbagai enzim (protease) dalam fermentasi berpotensi untuk meningkatkan kandungan protein dalam pembuatan hidrolisat protein keong mas. Penggunaan volume molase rebus dan lama fermentasi yang tepat sangat menentukan kualitas hidrolisat protein keong mas yang akan didapatkan. Dari uraian diatas dapat diambil rumusan masalah sebagai berikut:

- Bagaimana pengaruh penambahan volume molase rebus yang berbeda terhadap karakteristik hidrolisat protein keong mas segar?
- Bagaimana pengaruh lama fermentasi yang berbeda terhadap karakteristik hidrolisat protein keong mas segar?
- Bagaimana profil asam amino dan perlakuan terbaik hidrolisat protein keong mas segar?

### 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian tentang pengaruh penambahan volume molase rebus yang berbeda terhadap karakteristik hidrolisat protein keong mas segar (*Pomacea canaliculata*) segar selama masa fermentasi dengan starter khamir laut adalah:

- Untuk mendapatkan volume molase rebus yang tepat terhadap karakteristik hidrolisat protein keong mas segar.
- Untuk mendapatkan lama fermentasi yang tepat terhadap karakteristik hidrolisat protein keong mas.
- Untuk mengetahui profil asam amino pada perlakuan terbaik hidrolisat protein keong mas segar.

### 1.4 Hipotesis

Hipotesis yang mendasari penelitian ini adalah:

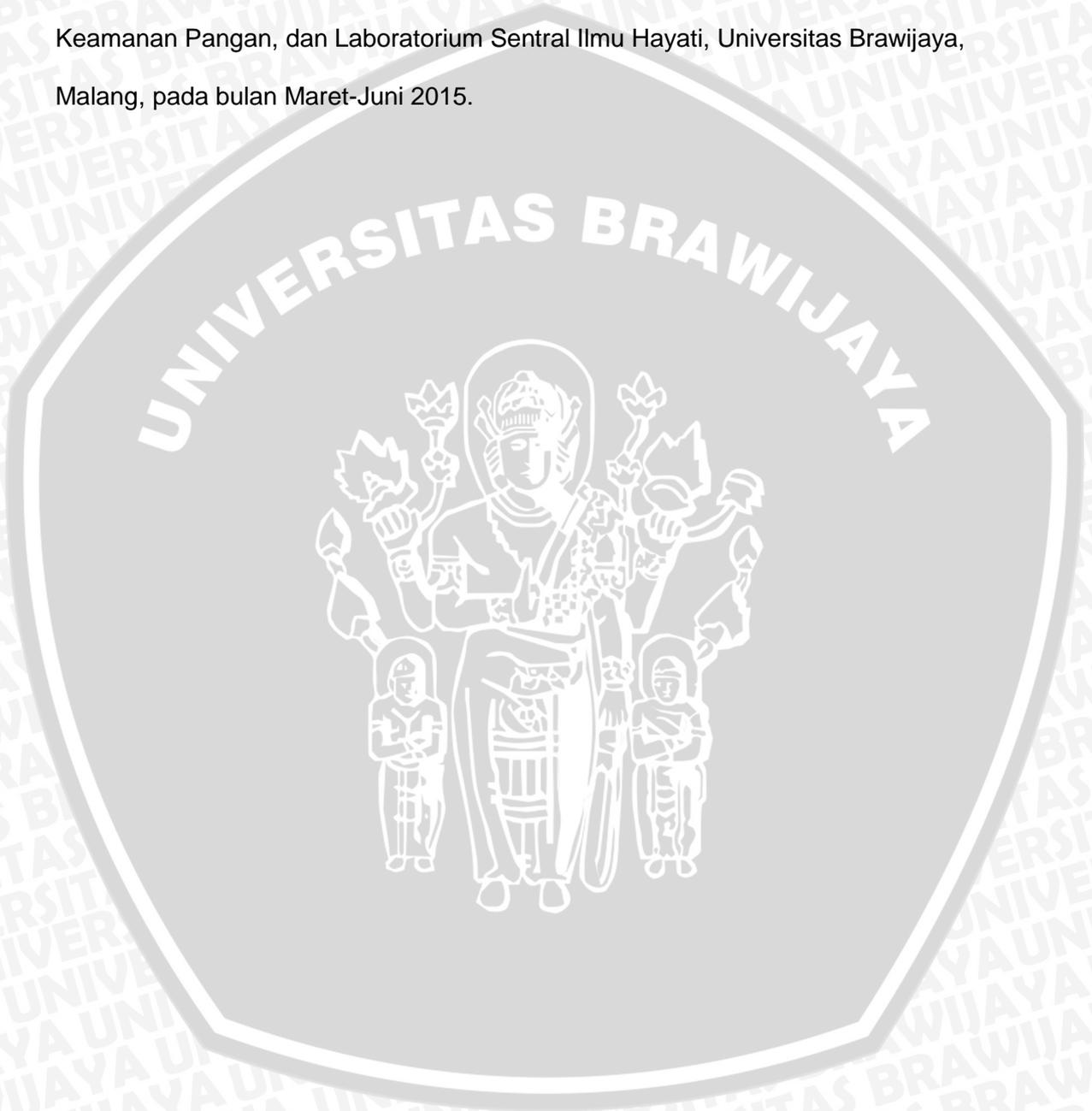
- Diduga volume molase rebus berpengaruh terhadap kualitas hidrolisat protein keong mas segar.
- Diduga lama fermentasi berpengaruh terhadap kualitas hidrolisat protein keong mas segar.
- Diduga perlakuan terbaik menghasilkan profil asam amino yang optimal.

### 1.5 Kegunaan penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai acuan dalam penggunaan volume molase rebus dan lama fermentasi yang berbeda dengan starter khamir laut terhadap kualitas hidrolisat protein keong mas (*Pomacea canaliculata*) segar.

### 1.6 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Keamanan Hasil Perikanan, Laboratorium Perekayasaan Hasil Perikanan, dan Laboratorium Nutrisi Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Laboratorium Pengujian Mutu dan Keamanan Pangan, dan Laboratorium Sentral Ilmu Hayati, Universitas Brawijaya, Malang, pada bulan Maret-Juni 2015.



## 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Keong Mas (*Pomacea canaliculata*)

Keong mas (*pomacea canaliculata*) merupakan molusca yang di tetapkan sebagai organisme pengganggu tanaman (OPT) atau hama utama pada tanaman padi (*oriza sativa*) di sawah. Berdasarkan identifikasi menurut Hendawati (2011), taksonomi keong mas sebagai berikut:

Phylum	: Mollusca
Class	: Gastropoda
Sub Class	: Prosobranchia
Ordo	: Megastropoda
Superfamily	: Cyclophorae/ Architaeniglossa
Family	: Ampullidae
Genus	: <i>Pomacea</i>
Spesies	: <i>Pomacea canaliculata</i>

Secara garis besar keong mas memiliki ciri-ciri yaitu cangkangnya berbentuk bulat mencapai tinggi lebih dari 10 cm, berwarna kekuningan. Pada mulut cangkang keong mas terdapat operculum yang bentuknya bulat berwarna coklat kehitaman pada bagian luarnya dan coklat kekuningan pada bagian dalamnya. Pada bagian kepala terdapat dua buah tentakel sepasang terletak dekat dengan mata lebih panjang dari pada dekat mulut. Kaki lebar berbentuk segitiga dan mengecil pada bagian belakangnya, mereka dapat hidup pada perairan yang deras dengan komponen utama tumbuhan air dan bangkai (Riyanto, 2003).



Gambar 1. Keong mas (*Pomacea canaliculata*)

Keong mas berpotensi sebagai hama utama karena sawah merupakan habitat yang cocok bagi perkembangannya, sehingga keong mas dapat berkembang biak sangat cepat dan mampu merusak tanaman padi dalam waktu yang cepat (Riyani, 2014)

Alasan mengapa menggunakan keong mas sebagai bahan baku pembuatan hidrolisat protein adalah karena memiliki kandungan nutrisi yang tinggi terutama kandungan protein yang tinggi. Kandungan protein keong mas mencapai 16-18% (Kurniawan *et al.*, 2012) Komposisi kimia keong mas utuh dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi kimia keong mas (*pomacea canaliculata*)

Komposisi	Segar	Rebus
Kadar Air	77,40%	68,36%
Kadar Abu	5,44%	4,40%
Kadar protein	14,04%	10,86%
Kadar lemak	0,99%	0,70%

Sumber: Dewi, (2012)

Dari data diatas keong mas segar dapat digunakan sebagai produk yang dapat dikonsumsi oleh manusia karena kandungan nutrisinya yang tinggi, salah satunya yaitu diolah menjadi produk Hidrolisat Protein.

## 2.2 Fermentasi

Fermentasi adalah proses produksi energi dalam sel dalam keadaan anaerobik (tanpa oksigen). Secara umum, fermentasi adalah salah satu bentuk respirasi anaerobik, Fermentasi juga dapat diartikan sebagai proses dimana komponen - komponen kimiawi dihasilkan sebagai akibat adanya pertumbuhan maupun metabolisme mikroba. (Apriwinda, 2013). Fermentasi merupakan salah satu upaya untuk mengubah senyawa karbohidrat menjadi etanol dengan bantuan mikroorganisme, fermentasi juga dapat dikatakan sebagai satu proses perubahan

kimia yang disebabkan oleh aktivitas mikroba ataupun oleh aktivitas enzim yang dihasilkan mikroba (Sebayang, 2006).

Pada proses fermentasi selalu berhubungan dengan lama waktu atau lama waktu fermentasi, perbedaan waktu fermentasi dapat menghasilkan perbedaan pada pertumbuhan mikroorganisme. Semakin lama waktu fermentasi maka akan semakin banyak pula mikroorganisme yang tumbuh sampai nutrisi pada media tersebut habis. Proses pemecahan karbohidrat dipengaruhi oleh aktivitas mikroorganisme yang digunakan pada fermentasi (Hidayati *et al.*, 2013).

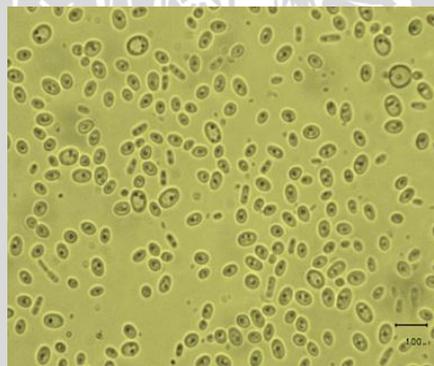
Proses pada pembuatan hidrolisat protein kerang hijau (*Mytilus viridis*) secara fermentasi dengan penambahan konsentrasi enzim papain 5%, dilakukan dengan waktu 24 jam (Purbasari, 2008). Fermentasi hidrolisat protein kepala udang rebus dengan penambahan khamir laut dan molase sebagai substrat dilakukan selama 12 hari (Budy, 2014). Pada penelitian hidrolisat protein keong mas segar (*Pomacea canaliculata*) dengan volume molase rebus difermentasi dengan menggunakan waktu 12 hari.

Pada proses fermentasi terjadi penguraian senyawa dari bahan-bahan protein kompleks. Proses fermentasi yang terjadi pada ikan merupakan proses penguraian secara biologis atau semibiologis terhadap senyawa-senyawa kompleks terutama protein menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana, dimana protein ikan akan terhidrolisis menjadi asam-asam amino dan peptida yang akan diurai lanjut menjadi komponen-komponen lain yang berperan dalam pembentukan cita rasa (Adawyah, 2007).

### 2.3 Khamir Laut

Khamir adalah organisme seluler dari golongan jamur, bersifat kemoorganotrof, bereproduksi seksual dengan spora dan aseksual dengan pertunasan atau pembelahan. Kultur khamir merupakan produk uniseluler yang dikeringkan beserta dengan substratnya yang dapat digunakan sebagai pakan. Setelah sampai pada alat pencernaan, khamir dapat hidup dan aktif kembali apabila kondisi sesuai dengan kehidupannya. Dalam saluran pencernaan khamir mampu memproduksi berbagai enzim protease (Febriani, 2006).

Khamir laut termasuk dalam salah satu jenis khamir yang diisolasi langsung dari laut, yang merupakan organisme uniseluler dari golongan jamur, yang memiliki sifat kemoorganotrof, bereproduksi seksual dengan spora dan aseksual dengan pertunasan atau pembelahan (Febriani, 2010). Khamir laut juga termasuk dalam golongan *fungi* dan dibedakan bentuknya uniseluler sebagai sel tunggal. Khamir dapat tumbuh didalam larutan yang pekat, seperti gula dan garam serta lebih menyukai suasana asam, serta adanya oksigen dilingkungan hidupnya (Baila, 2004). Gambar khamir laut dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Khamir Laut

Khamir laut dapat menghasilkan berbagai enzim seperti proteinase, amilase, deaminase, sukrose, maltose, fosfolipase, dan fosfatase, sehingga dapat berperan dalam pembuatan hidrolisat protein (Sukoso, 2012). Adapun kandungan

nutrisi, asam amino, asam lemak, dan mineral kultur khamir laut dapat dilihat pada

Tabel 2.

Tabel 2. Komposisi Kimia Khamir Laut

Kandungan		Presentase (%)	mg/100gr
Analisa Proksimat	Bahan kering	71,85	-
	Protein	28,29	-
	Lemak	0,34	-
	BETN	4,33	-
	Abu	66,09	-
Asam amino essensial	Arginin	0,206	-
	Histidin	0,262	-
	Isoleucin	0,310	-
	Leucin	0,318	-
	Lisin	0,463	-
	Threonin	0,187	-
	Metionin+sistin	0,773	-
	Valin	0,342	-
	Phenylalanin	0,274	-
Asam lemak	Oleat	14,447	-
	Linoleat	7,469	-
	Linolenat	0,875	-
	Stearat	28,726	-
	Laurat	1,842	-
	Palmitat	17,437	-
	P		2,276
	Cl		7,452,459
	Zn		266,241
	Mg	0,09	-

Sumber: Febriani, 2010

Didalam dinding sel khamir terdapat komponen-komponen seperti glukana khamir, mannan, protein, kitin, dan lipid. Protein pada dinding sel khamir tersebut jumlahnya relatif konstan yaitu: 6% - 10% dari berat kering dinding sel. Protein ini juga termasuk dalam enzim protease yang dapat memecah substrat (Fardiaz, 1989).

Peningkatan jumlah massa mikroba pada proses fermentasi dapat menyebabkan meningkatnya kandungan protein pada produk fermentasi yang merupakan refleksi dari jumlah massas sel. Mikroka dapat menghasilkan enzim yang mendegradasi senyawa-senyawa kompleks menjadi lebih sederhana serta mensintesis protein. Jenis khamir laut dapat meningkatkan kandungan protein

yang ada didalam bahan dengan adanya aktifitas enzimatis dari enzim protease, serta dengan lamanya waktu fermentasi memberikan kesempatan pada khamir untuk tumbuh dan berkembang sehingga mampu meningkatkan massa mikrobial protein (Anggorowati *et al.*, 2012).

Faktor-faktor yang dapat mempengaruhi pertumbuhan khamir laut meliputi Faktor intrinsik yaitu pH, aktivitas air, kemampuan mengoksidasi-reduksi, kandungan nutrisi, dan bahan karbon. Sedangkan faktor ekstrinsiknya yaitu suhu penyimpanan, kelembapan, dan tekanan gas (Rustan 2003).

Mikroorganisme yang digunakan dalam proses fermentasi akan memberikan hasil optimum apabila ditambahkan pada substrat ketika memasuki fase log. Fase log yaitu fase dimana mikroba membelah dengan cepat dan konstan dan pada fase ini kecepatan pertumbuhan sangat dipengaruhi oleh media tempat tumbuhnya seperti pH dan kandungan nutrisi, juga kondisi lingkungan termasuk suhu dan kelembapan udara (Yuliana, 2008). Pada waktu pembiakan 72 jam ke-72 khamir laut menunjukkan pertumbuhan jumlah sel terbanyak (Purwitasari *et al.*, 2004). Sedangkan pada hari ke-3 khamir laut telah memasuki fase stationer yaitu tidak melakukan pembiakan sel lagi (Kusmiati, 2011).

Khamir laut memerlukan substrat dan lingkungan yang sesuai untuk pertumbuhan hidupnya dan perkembangbiakannya. Salah satunya yaitu unsur dasar yang dibutuhkan khamir yaitu sumber karbon dan karbon yang berasal dari gula pereduksi, selain itu sumber karbon yang digunakan harus memiliki kandungan yang cukup tinggi dan sesuai (Sari *et al.*, 2014). Selain itu, khamir laut juga dapat berkembang biak dalam gula sederhana seperti glukosa ataupun gula kompleks disakarida yaitu sukrosa (Ahmad, 2005).

## 2.4 Molase

Molase merupakan limbah yang berasal dari pengolahan tebu yang berbentuk cairan yang kental, dan berwarna coklat tua kehitaman, memiliki aroma yang berbau manis atau harum khas. Molase termasuk medium pertumbuhan kompleks yang kaya akan sukrosa, gula yang umumnya dapat difermentasi oleh khamir laut adalah glukosa, galaktosa, maltosa, sukrosa, laktosa, trehalosa, melibiosa, dan rafinosa (Noviati, 2007). Pemanfaatan molase selain digunakan untuk memperoleh etanol juga akan meningkatkan nilai ekonomis molase. Molase mengandung antara lain : Sukrosa 55%, Gula mereduksi 18,27%, Abu sulfat 12,74%, Pol 29,25%, Brick 81,27% (Yusma, 1999). Komposisi kimia molase dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Komposisi kimia molase

Komposisi Kimia	Kandungan (%)		
	Molase	Molase Rebus	
Kandungan Gula	Fruktosa	4,5652	3,9174
	Gula reduksi	1,5602	2,1615
	Sukrosa	0,5299	0,3962
	Air	66,20	64,63
	Protein	23,23	24,64
	Karbohidrat	6,36	5,73
	Abu	4,13	4,95
	Lemak	0,08	0,05
Asam Amino	L-Asam Glutamat	2,912	3,594
	L-Prolin	0,640	0,350
	L-Alanin	0,610	0,512
	L-Asam Aspartat	0,405	0,669
	L-Serin	0,069	0,234
	L-Glisin	0,051	0,187
	L-Valin	0,046	0,124
	L-Lisin	0,035	0,966
	L-Leusin	0,027	0,121
	L-Isoleusin	0,024	0,084
	L-Treonin	0,021	0,112
	L-Tirosin	0,015	0,060
	L-Histidin	0,014	0,074
	L-Fenilalanin	0,009	0,073
	L-Metionin	0,008	0,034
L-Arginin	0,007	0,107	
L-Sistein	-	0,081	

Sumber: (Rohim, 2014)

Molase dapat digunakan sebagai sumber karbon yang paling disukai oleh khamir laut dibandingkan dengan glukosa, sukrosa dan air beras. Molase lebih umum digunakan sebagai bahan baku industri etanol karena tidak memerlukan proses awal terlebih dahulu seperti bahan berpati atau berselulosa. Namun, penggunaan konsentrasi gula reduksi dalam molase sebagai sumber karbon dan nutrisi tambahan berupa urea sebagai sumber nitrogen sangat bervariasi pada tiap industri yang memanfaatkannya, jadi manfaat dari molase terhadap pertumbuhan khamir yaitu sebagai sumber nutrisi dan sumber karbon (Wiratno *et al.*, 2008).

Molase sebagai media fermentasi digunakan sebagai sumber makanan bagi khamir laut selama proses fermentasi berlangsung. Bakteri akan menggunakan sumber karbohidrat sebagai sumber makanannya. Ketika sumber karbohidrat didalam medium telah habis terpakai, maka khamir laut beralih menggunakan sumber nitrogen. Penambahan karbohidrat seperti molase dimaksudkan untuk mempercepat terbentuknya sumber energi yang cepat tersedia bagi khamir laut (Nurul, 2005).

Perebusan molase dapat menyebabkan sebagian sukrosa dalam molase akan terhidrolisis menjadi senyawa yang lebih sederhana yaitu gula invert (fruktosa dan glukosa) yang merupakan gula pereduksi (Susanto dan Setyohadi, 2011), dimana senyawa karbon dari jenis monosakarida (glukosa, fruksota dan galaktosa) dapat diasimilasi lebih cepat dibandingkan dengan disakarida (sukrosa dan maltosa), sehingga dapat segera digunakan khamir laut untuk pertumbuhannya (Sukoso, 2012). Fajarwati (2002) menambahkan perebusan molase juga dapat mengurangi kerusakan pada molase akibat mikroorganisme kontaminan. Pemanasan molase pada suhu 120-125°C selama  $\pm$  1 jam setelah mendidih dapat mengendapkan beberapa material organik dan material tersuspensi lainnya yang dapat menghambat pertumbuhan khamir laut, seperti nitrit, zat pewarna, koloid asam butirat ion kalsium (Ca) dan sulfat.

Pada proses pembuatan hidrolisat protein kepala udang vannamei secara enzimatis dengan teknik fermentasi volume molase yang digunakan sebanyak 3 kali perlakuan yaitu 100 mL, 200 mL, dan 300 mL. Penggunaan volume molase ini telah digandakan dua kali lipat dari volume 50 mL, 100 mL dan 150 mL (Fathony, 2014).

Penambahan sumber karbohidrat seperti molase ini dimaksudkan untuk mempercepat terbentuknya asam laktat serta menyediakan sumber energi yang cepat terbentuk dan cepat tersedia bagi mikroba tersebut. Komposisi nutrisi molase dalam 100% bahan kering adalah 0,3% lemak kasar, 0,4% serat kasar, 3,94% protein kasar dan 11% abu (Sutardi,1981).

## **2.5 Perebusan**

Perebusan adalah proses pemasakan dengan menggunakan suhu panas ( $\pm 100^{\circ}\text{C}$ ), dan termasuk dalam kategori pemanasan basah karena menggunakan media air. Pemanasan dan air merupakan carapengolahan yang dapat menurunkan sifat sianogenik karena HCN dapat menguap dengan pemanasan dan HCN juga luruh dengan adanya air. Melalui pemanasan enzim yang bertanggung jawab terhadap pemecahan linamarin menjadi inaktif dan hidrogen sianida tidak terbentuk (Ardiansari, 2012).

Pemasakan dengan melibatkan panas merupakan salah satu proses pengolahan pangan yang banyak dilakukan baik pada skala rumah tangga atau skala industri. Beberapa cara pemasakan yang umum dilakukan adalah perebusan, pengukusan dan penumisan. Perebusan adalah proses pemasakan dalam air mendidih sekitar  $100^{\circ}\text{C}$ , yang dimana air sebagai media penghantar panas. Pengukusan merupakan proses pemasakan dengan medium uap air panas yang dihasilkan oleh air mendidih, sedangkan penumisan merupakan proses pemasakan dengan menggunakan sedikit minyak dan air (Aisyah, 2014).

Bahan makanan mengandung molekul-molekul berbagai senyawa yang terikat satu sama lain melalui ikatan hidrogen. Proses perebusan atau pemanasan dengan media air dapat mengurangi daya tarik-menarik antara molekul-molekul air dan memberikan cukup energi kepada molekul-molekul air tersebut sehingga dapat mengatasi daya tarik menarik antar molekul bahan pangan tersebut. Perebusan juga dapat memberikan pengaruh dalam perubahan komponen kimia dari molase, dimana molase merupakan hasil samping dari pembuatan gula sehingga tinggi akan kandungan sukrosa. Pada saat perebusan molase, setiap molekul sukrosa akan dipecah menjadi glukosa dan fruktosa yang disebut dengan gula invert (Winarno, 2004).

## 2.6 Hidrolisat Protein Ikan

Hidrolisat protein ikan (HPI) adalah protein ikan yang telah terurai menjadi turunan-turunan protein karena adanya proses hidrolisis oleh enzim asam ataupun basa (Haslina, 2004). Hidrolisis protein mengalami degradasi hidrolitik dengan asam, basa, atau dengan enzim proteolitik yang menghasilkan produk berupa asam amino dan peptida. Penggunaan enzim dalam menghidrolisis protein dianggap paling aman dan menguntungkan. Hal ini disebabkan kemampuan enzim proteolitik dalam menghidrolisis protein dapat menghasilkan produk hidrolisat yang terhindar dari perubahan dan kerusakan produk (Kurniawan, 2012).

Hidrolisat protein ikan merupakan produk yang dihasilkan dari penguraian protein ikan menjadi senyawa-senyawa berantai pendek karena adanya proses hidrolisis baik oleh enzim, asam maupun basa (Bernadetta *et al.*, 2012) Pada umumnya hidrolisat protein digunakan untuk memperbaiki karakteristik berbagai produk pangan. Manfaat hidrolisat protein yaitu sebagai penyedap rasa, sebagai lanjutan untuk isolasi asam amino, serta untuk pengobatan (Purbasari, 2008).

Faktor yang mempengaruhi terhadap kecepatan hidrolisis dan kekhasan produk pada proses pembuatan hidrolisat protein yaitu, suhu, waktu hidrolisis, dan konsentrasi enzim yang ditambahkan, sedangkan tingkat kerusakan asam amino dipengaruhi oleh kemurnian protein dari bahan awal, serta kondisi dan jenis bahan penghidrolisis yang digunakan. Lama proses hidrolisis merupakan faktor yang paling berpengaruh terhadap mutu hidrolisat yang dihasilkan (Haslina, 2004).

Hidrolisat protein dapat berbentuk cair, pasta, atau tepung yang bersifat higroskopis. Produk hidrolisat mempunyai kelarutan tinggi pada air, kapasitas emulsinya baik, serta kemampuan mengembang besar (Purbasari, 2008). Produk hidrolisat protein memiliki rasa pahit yang merupakan ciri khas produk HPI yang disebabkan oleh peptida berantai pendek sebagai produk hasil dari pemecahan protein. Sedangkan rasa manis pada HPI disebabkan oleh asam amino glisin selama hidrolisis, sedangkan rasa gurih yang dihasilkan disebabkan oleh pembentukan oligopeptida yang tinggi dari asam glutamat selama proses hidrolisis (Budy, 2014).

Semakin lama fermentasi maka semakin banyak gula yang dapat digunakan oleh *Saccharomyces cerevisiae*. Penurunan total gula ini terjadi karena adanya penggunaan glukosa oleh *Saccharomyces cerevisiae* untuk metabolisme. *Saccharomyces cerevisiae* mampu menggunakan sejumlah gula diantaranya adalah glukosa. Glukosa digunakan sebagai sumber nutrisi untuk pertumbuhan khamir. Pengurangan kadar total gula di dalam medium fermentasi terjadi akibat adanya penggunaan sumber karbon oleh *Saccharomyces cerevisiae*. Untuk mempertahankan hidup, *S. cerevisiae* memerlukan energi diantaranya ATP (Adenosin Triphosphat) dan untuk mendapatkannya maka *S. cerevisiae* mengkonsumsi gula yang dapat berupa glukosa dan fruktosa serta gula sederhana lainnya (Utami dan kindriari, 2008).

Pembentukan dan stabilitas busa dapat dipengaruhi oleh pH, suhu, garam, gula, lemak dan sumber protein. Pada volume dan stabilitas busa akan menjadi semakin bertambah dengan meningkatnya konsentrasi protein yang diuji. Daya buih yang terbentuk pada konsentrasi bersifat padat dan stabil karena lapisan permukaan lebih tebal. (Nurhayati *et al.*, 2013). Didalam produk hidrolisat protein daya buih sangat dipengaruhi oleh jumlah protein yang terhidrolisis selama proses, tetapi tidak dapat untuk menentukan stabilitas buih atau sebaliknya (Koesoemawardhani, 2011). Pada produk hidrolisat protein selain daya buih karakteristik pada hidrolisat protein yaitu kapasitas emulsi.

Kapasitas emulsi pada dasarnya adalah suatu sistem yang tidak stabil, karena masing-masing partikel mempunyai kecenderungan untuk bergabung dengan partikel sesama lainnya membentuk suatu agregat yang akhirnya dapat mengakibatkan emulsi tersebut pecah (Rita, 2011). Kestabilan emulsi akan lebih baik pada derajat hidrolisis yang rendah. Hal ini karena peptida panjang yang terserap dalam lapisan minyak dan memicu terbentuknya tetesan minyak yang kecil, akibatnya kestabilan emulsi lebih tinggi. Perbedaan stabilitas emulsi pada hidrolisat yang dihasilkan oleh masing-masing enzim yang digunakan bergantung pada sifat spesifik enzim didalam memecah protein dan gugus aktifnya (Gbogouri *et al.*, 2004).

### 3. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Materi Penelitian

##### 3.1.1 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan untuk kultur khamir laut terdiri dari air laut, gula pasir, pupuk daun (hortigro), starter khamir laut, kapas, plastik wrap, dan plastik. Bahan-bahan yang digunakan untuk perhitungan kepadatan sel khamir laut terdiri dari stok khamir laut, gula pasir, pupuk daun (hortigro), kapas, alkohol dan tissue. Bahan-bahan yang digunakan untuk pembuatan hidrolisat protein terdiri dari keong mas segar (*Pomacea canaliculata*) yang didapatkan dari kolam –kolam masyarakat yang terletak di Desa Kauman Kabupaten Tulungagung Jawa Timur, sebagian bahan dasar pembuatan hidrolisat protein, bahan dasar lain yang digunakan yaitu molase, akuades dan inokulum khamir laut.

Bahan-bahan yang digunakan analisis kimia terdiri dari silika gel, benang kasur, kertas saring, PE, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidrous, larutan OPA (O-Phtaldehyde), tablet kjeldahl, akuades, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, NaOH, HCl, indikator *metil orange*, biuret, kertas label, dan minyak jagung.

##### 3.1.2 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam pembuatan kultur khamir laut terdiri dari botol kaca, kompor, panci perebusan, spatula, pipet volume, bola hisap, timbangan digital, *aerator*, selang, corong, dan *beaker glass*. Peralatan yang digunakan untuk perhitungan kepadatan sel khamir laut terdiri dari mikroskop, mikropipet, *cover glass*, rak tabung reaksi, tabung reaksi, *vortex mixer*, bola hisap, pipet volume, erlenmeyer 250 mL, gelas ukur, timbangan digital, spatula, sprayer, dan corong. Peralatan yang digunakan untuk pembuatan hidrolisat protein keong mas segar terdiri dari kompor, panci, waterbath, *beaker glass*, timbangan digital, bola hisap,

pipet volume, piring, penggiling daging, spatula, nampan, baskom, sentrifuge, selang, aerator, botol, cuvet, blender, dan *food processor*.

Alat-alat yang digunakan untuk analisis kimia terdiri dari pH meter, oven, desikator, botol timbang, loyang, *crushable tang*, *gold fisch*, sampel tube, gelas piala, gelas ukur, corong, timbangan digital, cuvet, sentrifuge, pipet tetes, pipet volume, bola hisap, cawan petri, spatula, tabung reaksi, rak tabung reaksi, *beaker glass*, cawan porselin, destruksi, destilasi, statif, biuret, *hot plate*, *mufflle*, dan *High Performance Liquid Cromathography*.

### 3.2 Metode Penelitian

#### 3.2.1 Metode

Metode yang digunakan dalam penelitian ini yaitu metode eksperimen. metode penelitian eksperimen adalah metode sistematis guna membangun hubungan yang mengandung fenomena dari sebab-akibat. Hal ini dilakukan untuk memperoleh informasi tentang variabel mana yang menyebabkan sesuatu terjadi dan variabel akibat dari terjadinya perubahan dalam suatu kondisi eksperimen (Azizah, 2013)

Penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahap yaitu pembuatan kultur khamir laut untuk mendapatkan inokulum khamir laut yang dipanen pada fase pertumbuhan atau log. Setelah itu, inokulum yang didapat digunakan sebagai biokatalisator dengan tujuan untuk mengetahui hidrolisat protein keong mas segar berdasarkan analisis proksimat, pH kapasitas emulsi, dan daya buih, sehingga nanti dari hasil yang terbaik digunakan untuk acuan dalam analisis profil asam amino.

### 3.2.2 Variabel

Variabel adalah segala faktor yang berperan atau berpengaruh terhadap suatu percobaan. Menurut Brink dan Wood (2000), variabel adalah faktor yang mengandung lebih dari satu nilai di dalam metode statistik. Variabel terdiri dari variabel bebas yang artinya variabel penyebab atau variabel yang mempengaruhi dimana variabel dalam kelompok sampel dibedakan. Dalam kata lain peneliti harus dapat memisahkan sampel dalam kelompok alternatif didasarkan pada variabel. Sedangkan variabel terikat yaitu faktor yang diakibatkan oleh pengaruh tersebut.

Penelitian ini terdapat dua variabel yaitu variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah volume molase rebus dan lama fermentasi, sedangkan variabel terikat dalam penelitian ini adalah analisis proksimat meliputi kadar air, kadar lemak, kadar protein, kadar abu, dan kadar karbohidrat, pH, daya buih, kapasitas emulsi, dan profil asam amino.

Berdasarkan variabel bebas atau perlakuan, penelitian ini di rancang dengan menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK), dengan tiga perlakuan dan tiga kali ulangan. Dengan perlakuan molase segar 200 mL, 300 mL dan 400 mL dan lama fermentasi pada hari ke-0, hari ke-3, hari ke-6, hari ke-9 dan hari ke-12. Model rancangan percobaan ini penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4 . Rancangan Percobaan Penelitian

Perlakuan	Kelompok					Total	Rerata
Vol.	0	3	6	9	12		
Molase (mL)							
200 mL							
300 mL							
400 mL							

Data yang diperoleh akan dilakukan analisa dengan menggunakan ANOVA (Analysis of Variance) menggunakan uji F dengan membandingkan antara F hitung dengan F tabel.

- Jika  $F_{hitung} < F_{tabel}$  5%, maka perlakuan tidak berbeda nyata.

- Jika  $F_{hitung} > F_{tabel 1\%}$ , maka perlakuan menyebabkan hasil sangat berbeda nyata.
- Jika  $F_{tabel 5\%} < F_{hitung} < F_{tabel 1\%}$ , maka perlakuan menyebabkan hasil berbeda nyata.

Apabila hasil analisis menunjukkan adanya pengaruh yang nyata atau sangat nyata ( $F_{hitung} > F_{tabel 5\%}$ ) maka dilanjutkan uji BNT 5% menggunakan Ms. Office Excel 2013 untuk menentukan yang terbaik.

### 3.3 Prosedur Penelitian

#### 3.3.1 Prosedur Pembuatan Kultur Khamir

Prosedur yang dilakukan untuk menentukan fase log yaitu dapat dilakukan dengan menggunakan *haemocytometer* dan mikroskop. pengamatan dilakukan dengan mengamati setiap 12 jam sekali kultur khamir untuk diukur kepadatannya dengan menggunakan *haemocytometer* dan mikroskop. Prosedur pertama yang dilakukan dalam penentuan fase log yaitu mengkultur khamir laut. Tahapan dalam mengkultur khamir laut menurut Sukoso (2012) yaitu menyiapkan bahan-bahan seperti air laut, gula pasir, pupuk daun, dan biakan khamir laut. air laut yang digunakan sebanyak 1000 mL disterilkan dengan pemanasan sampai mendidih kemudian didinginkan pada suhu kamar. air laut steril yang sudah dingin kemudian dimasukkan ke dalam botol gelas kaca, lalu ditambahkan gula pasir 0,5% sebagai sumber nutrisi dan pupuk daun 0,2% sebagai sumber nitrogen (v:b) serta dihomogenkan sehingga diperoleh media khamir laut. Lalu ditambah starter khamir laut sebanyak 0,2% dari air laut yang digunakan (v:v) dan dihomogenkan. Kultur khamir laut yang telah siap kemudian ditutup dengan kapas dan dilapisi plastik *wrap* untuk menghindari kontaminasi yang tidak diinginkan, lalu diberi aerasi yang cukup untuk menambah suplai oksigen dalam pertumbuhan khamir laut. Aerasi

dilakukan selama empat hari untuk dilakukan pengamatan tingkat kepadatan sel khamir laut. Prosedur skema kerja pembuatan khamir laut dapat dilihat pada lampiran 2.

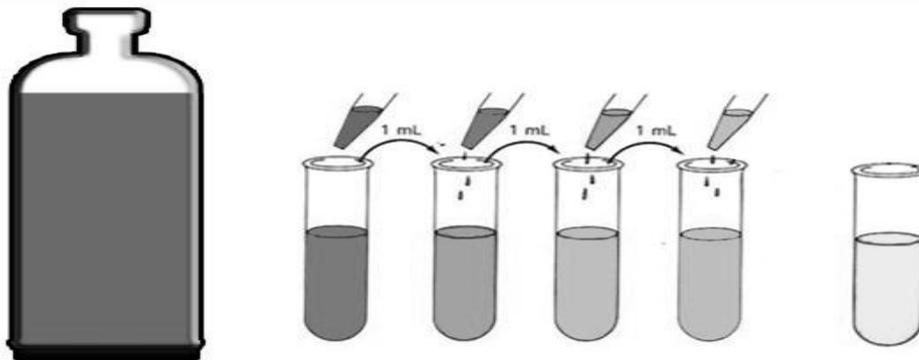
### 3.3.2 Prosedur Penentuan Fase Log Khamir Laut

Penentuan fase log dilakukan dengan pengamatan melalui *haemocytometer* dan mikroskop. Pengamatan dilakukan dengan mengamati setiap 12 jam sekali kultur khamir laut untuk diukur kepadatannya dengan menggunakan *haemocytometer* dan mikroskop.

Prosedur perhitungan kepadatan sel khamir laut yaitu pada hari pertama sampai hari ke-empat kultur khamir laut yang telah diaerasi diambil sebanyak 1 mL untuk dilakukan pengenceran dari  $10^{-1}$  sampai  $10^{-4}$ . Namun terlebih dahulu disiapkan media yang akan digunakan. prosedur pembuatan khamir laut menurut Alkili (2012) yaitu air laut sebanyak 100 mL disterilkan dengan pemanasan sampai mendidih kemudian didinginkan pada suhu kamar, kemudian diambil air laut steril sebanyak 50 mL dan dimasukkan ke dalam enlemeyer, kemudian ditambihin gula pasir sebanyak 0,25% (b/v) kemudian pupuk daun sebanyak 0,1% (b/v) serta dihomogenkan. perhitungan dan diagram alir pembuatan media pengenceran khamir laut.

Setelah media yang akan digunakan sudah siap, langkah selanjutnya adalah perhitungan kepadatan sel khamir laut dengan menggunakan *haemocytomete*. Prosedur kerja yang digunakan yaitu diambil 9 mL media khamir laut kemudian dimasukkan pada masing-masing lima tabung reaksi untuk diberi perlakuan tingkat pengenceran  $10^{-1}$  sampai  $10^{-4}$  dan sebagai blanko. Tabung reaksi  $10^{-1}$  yang telah berisi media diberi dengan kultur khamir laut sebanyak 1 mL yang telah diaerasi, lalu dihomogenkan dengan menggunakan *vortex mixer*. Setelah itu, dari tabung reaksi  $10^{-1}$  yang telah dihomogenkan diambil sebanyak 1 mL. untuk dimasukkan ke dalam tabung reaksi  $10^{-2}$  dan dihomogenkan, serta

dilakukan dengan cara yang sama sampai tabung reaksi  $10^{-4}$ . Selanjutnya, dari hasil pengenceran  $10^{-4}$  diuji kepadatan khamir laut dengan *haemocytometer*.



Kultur khamir yang telah diaerasi

Gambar 3. Proses Pengenceran Bertingkat Khamir Laut

Pengamatan kepadatan khamir laut juga dilakukan setiap hari dengan menggunakan pengamatan mikroskop, yaitu dengan mengambil kultur khamir laut yang telah diaerasi dengan menggunakan pipet tetes lalu ditetaskan di *objek glass* dan ditutup dengan *cover glass*. *Prepare* kultur khamir laut selanjutnya diamati di bawah mikroskop. Pada pengamatan tingkat kepadatan khamir laut, ada fase log yang ditandai dengan pertumbuhan sel yang paling tinggi dibandingkan dengan fase lainnya. Fase log sendiri yakni fase dimana mikroorganisme mengalami pertumbuhan yang sangat cepat dan dapat dikatakan sebagai pertumbuhan eksponensial. Pada fase log ini kebutuhan energi lebih tinggi dan sel menjadi lebih sensitif terhadap lingkungannya. Oleh karena itu pada fase ini mikroba termasuk didalamnya khamir laut banyak memproduksi zat-zat metabolit yang dibutuhkan dalam memenuhi kebutuhan nutrisinya (Waluyo, 2007)

Setelah diamati di bawah mikroskop dan *haemocytometer* didapatkan data kepadatan khamir laut. Data kepadatan khamir laut dapat dilihat pada Lampiran 5. Data jumlah kepadatan sel khamir laut saat dilakukan pengenceran dapat dilihat

pada Lampiran 6. Perhitungan kepadatan sel khamir laut dapat dilihat pada Lampiran 7. Dari hasil data menunjukkan bahwa kepadatan khamir laut yakni fase logaritmik terdapat pada hari ke-3 dengan kepadatan khamir laut sebanyak  $7,65 \times 10^{10}$  sel/ mL. Dari hasil pengamatan kepadatan khamir laut ini nantinya digunakan sebagai landasan pada penelitian utama. Sehingga pada pembuatan hidrolisat protein keong mas menggunakan khamir laut sebanyak 20 mL pada setiap perlakuan dengan kepadatan khamir laut  $7,65 \times 10^{10}$  sel/ mL.

### 3.3.3 Prosedur Pembuatan Hidrolisat Protein Keong Mas

Pada pembuatan hidrolisat protein keong mas segar, prosedur pertama yang dilakukan yaitu membersihkan keong dari cangkangnya, karena pembuatan hidrolisat protein keong hanya diambil dagingnya saja. Prosedur penelitian disini mengacu pada penelitian Noviana (2012) adalah Pertama keong dibersihkan dari cangkang dan diambil dagingnya, kemudian keong dipotong kecil-kecil, kemudian keong direndam menggunakan garam sebanyak 3,5% dari berat keong, kemudian direndam dengan garam selama 30 menit. Setelah itu keong mas dihaluskan menggunakan penggilingan daging sampai halus, dilakukan penghalusan supaya daging yang sudah dihaluskan mudah tercampur dengan komponen lain. Komposisi gizi suatu bahan pangan terdiri dari empat komponen utama antara lain air, protein, karbohidrat dan lemak. Jumlah masing- masing komponen berbeda tergantung dari sifat ilmiah bahan contohnya, kekerasan, warna, dan citarasa (Winarno, 2007).

Pada penelitian ini juga menggunakan molase (tetes tebu) rebus, dimana proses perebusannya dilakukan sampai mendidih karena molase memiliki sifat sebagai sumber nitrogen dan sumber karbon yang dapat digunakan sebagai pengganti gula sehingga mudah mengalami karamelisasi. Hal ini sesuai dengan pernyataan Kusnandar (2010) bahwa reaksi karamelisasi adalah salah satu reaksi pencoklatan non enzimatis. Gula dipanaskan secara terus menerus sampai suhu

diatas titik lelehnya misalnya  $>170^{\circ}\text{C}$ , maka akan terjadi karamelisasi sukrosa. Pada penelitian ini menggunakan penambahan molase rebus dan lama fermentasi yang berbeda. Perlakuan penelitian dengan berbagai variabel dapat dilihat pada Tael 5.

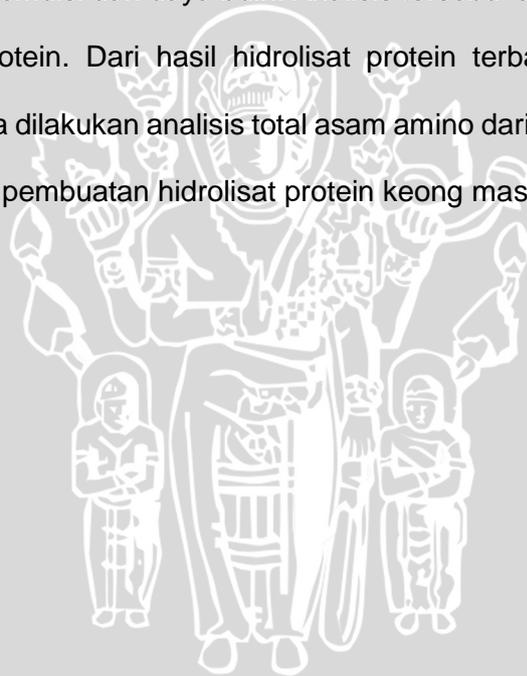
Tabel 5. Tabel berbagai perlakuan pada penelitian

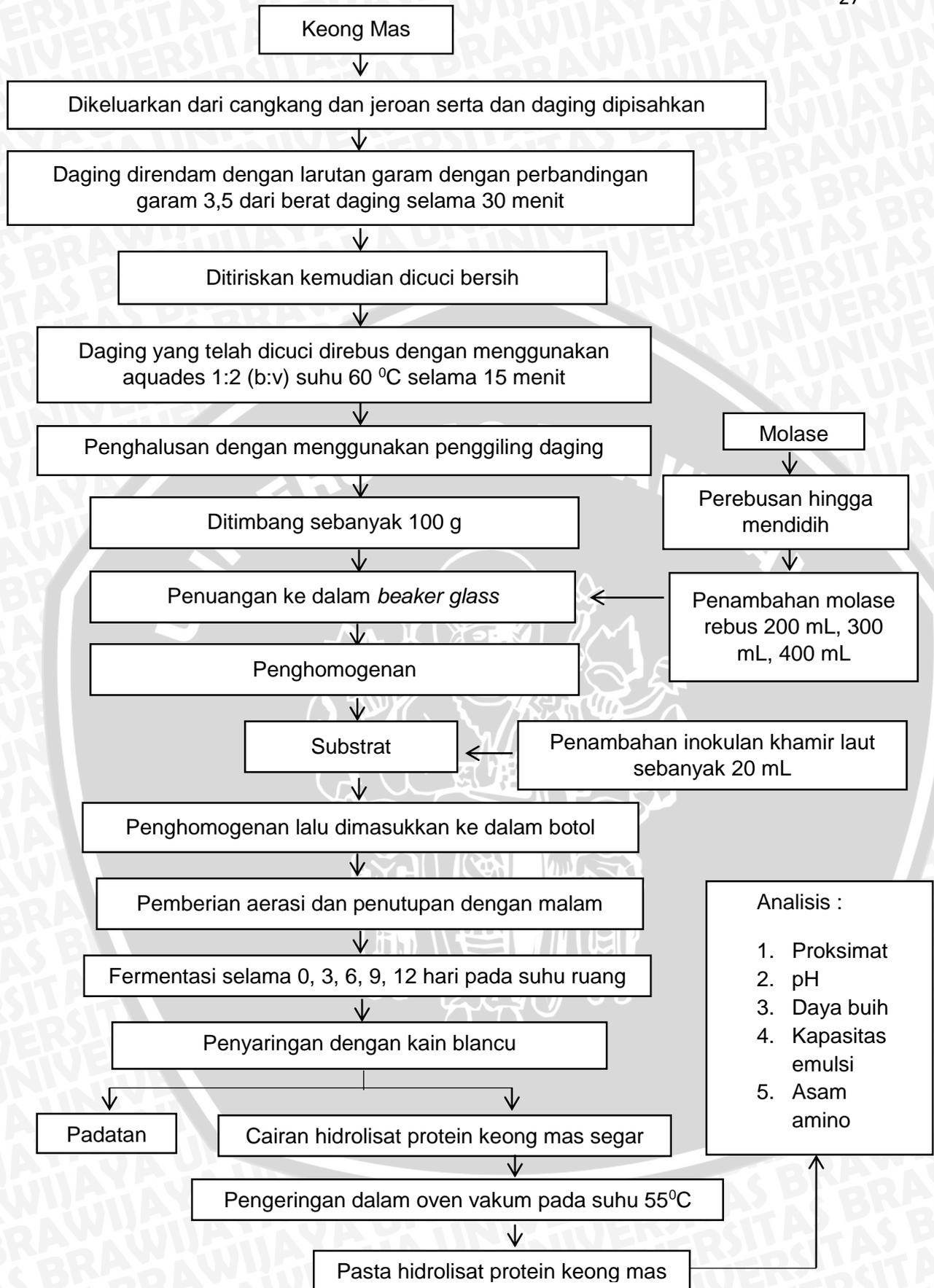
Perlakuan	Molase Rebus			
	1	2	3	
Lama Fermentasi	A	A1	A2	A3
	B	B1	B2	B3
	C	C1	C2	C3
	D	D1	D2	D3
	E	E1	E2	E3

Keterangan : A = lama Fermentasi 0 hari    1 = volume molase rebus 200 mL  
 B = lama Fermentasi 3 hari    2 = volume molase rebus 300 mL  
 C = lama Fermentasi 6 Hari    3 = volume molase rebus 400 mL  
 D = lama Fermentasi 9 hari  
 E = lama Fermentasi 12 hari

Pada penelitian ini molase yang digunakan menggunakan konsentrasi yang berbeda-beda yaitu 200 mL, 300 mL dan 400 mL, tujuan diberikan konsentrasi yang berbeda-beda adalah untuk mengetahui efektifitas molase rebus terhadap proses pembuatan hidrolisat protein keong mas segar. Kemudian ditambahkan inokulum khamir laut sebanyak 20 mL. Khamir laut yang digunakan adalah khamir yang mengalami fase logaritmik karena itu adalah fase pertumbuhan khamir laut menuju pertumbuhan tertinggi. Tujuan dari penambahan khamir laut yaitu sebagai starter dalam proses hidrolisis peong mas segar. Kemudian dilakukan proses fermentasi dilakukan pengamatan pada hari ke 0, 3, 6, 9 dan 12 tujuan dari lama fermentasi yang berbeda yaitu untuk mengetahui tingkat efektifitas fermentasi dalam proses pembuatan hidrolisat protein keong mas segar. Langkah selanjutnya yaitu dilakukan analisis terhadap hasil fermentasi hari ke 0, 3, 6, 9 dan hari ke-12. Sebelum dilakukan analisis kandungan nilai gizi hidrolisat protein keong mas diperas terlebih dahulu menggunakan kain blacu.

Tujuan dari dilakukan pemerasan yaitu untuk memisahkan antara cairan dan endapan pada sampel hidrolisat protein tersebut. Setelah itu cairan hidrolisat protein dioven vakum selama  $\pm 15$  jam dengan suhu  $55^{\circ}\text{C}$ , tujuan dari dilakukan pengovenan vakum menggunakan suhu  $55^{\circ}\text{C}$  adalah supaya tidak merusak pada kadar protein dalam hidrolisat protein. Selain itu, kadar air hidrolisat protein akan turun dan menjadi bentuk pasta. Hal tersebut terjadi dikarenakan adanya proses evaporasi, dimana pada prinsipnya adalah menguapkan air yang terdapat pada bahan (larutan pekat) menggunakan vakum (tanpa ada udara) dengan tekanan tinggi. Selanjutnya dilakukan analisis kimia antara lain analisis proksimat. Selain itu dilakukan analisis pH, emulsi dan daya buih. Analisis tersebut adalah karakteristik fisik dari hidrolisat protein. Dari hasil hidrolisat protein terbaik tiap perlakuan fermentasi, selanjutnya dilakukan analisis total asam amino dari perlakuan terbaik. Prosedur skema kerja pembuatan hidrolisat protein keong mas dapat dilihat pada Gambar 4.





Gambar 4. Diagram Alir Pembuatan Hidrolisat Protein Keong Mas

### 3.4 Pengamatan dan Parameter Uji

#### 3.4.1 Pengamatan

Pengamatan yang dilakukan meliputi rendemen, analisa proksimat (kadar air, kadar abu, kadar protein, kadar lemak, dan kadar karbohidrat *by difference*), pH, daya buih, kapasitas emulsi, dan profil asam amino.

#### 3.4.2 Rendemen

Menurut Yunita (2009) Rendemen merupakan persentase perbandingan antara produk yang dihasilkan terhadap bahan bakunya. Purbasari (2008) mengatakan bahwa rendemen adalah jumlah persentase sampel akhir setelah proses dan dinyatakan dalam % (persen). Rendemen produk hidrolisat protein merupakan persentase banyaknya produk hidrolisat yang dihasilkan terhadap bahan baku yang digunakan sebelum hidrolisis. Persamaan yang dapat digunakan untuk menghitung rendemen adalah:

$$\text{Rendemen } \frac{A}{B} (\%) = x 100\%$$

Keterangan : A = Berat akhir hidrolisat (setelah diperas/dikeringkan) (g)

B = Berat awal sampel setelah pencampuran (g)

#### 3.4.3 Analisis Proksimat

##### 3.4.3.1 Analisis Kadar Air

Menurut Legowo, 2007 Analisis yang digunakan adalah dengan cara pengeringan. Metode pengeringan dengan oven didasarkan atas prinsip perhitungan selisih bobot bahan (sampel) sebelum dan sesudah pengeringan. Selisih bobot tersebut merupakan air yang teruapkan dan dihitung sebagai kadar air bahan. Prinsip metode ini adalah mengeringkan sampel dalam oven dengan suhu 100 – 105°C sampai bobot konstan dan selisih bobot awal dengan bobot

akhir dihitung sebagai kadar air. Prosedur dan perhitungan kadar air metode pengeringan oven adalah sebagai berikut:

- Siapkan cawan porselin yang telah diberi kode sesuai kode sampel, kemudian panaskan dalam oven dengan suhu 100 – 105°C selama ± 1 jam.
- Ambil cawan porselin, masukkan dalam desikator ± 15 menit, kemudian cawan ditimbang.
- Timbang sampel sebanyak 1 – 2 g dalam cawan porselin yang telah diketahui beratnya.
- Keringkan dalam oven pada suhu 100 – 105°C selama 4 – 6 jam. Ditimbang, dioven kembali dan ditimbang hingga konstan. Bobot dianggap konstan apabila selisih penimbangan tidak melebihi 0,2 mg.
- Masukkan dalam desikator ± 15 menit, dilanjutkan dengan penimbangan
- Kadar air dapat dihitung dengan rumus:

$$\text{Berat Basah (\% WB)} = \frac{(A+B) - C}{B} \times 100\%$$

Dimana :

A : berat botol timbang

B : berat sampel

C : berat akhir (botol timbang +sampel) yang telah dikeringkan

#### 3.4.3.2 Analisis Kadar Lemak

Menurut Sudarmadji *et al.*,(1989), analisis kadar lemak menggunakan metode goldfish. Metode goldfish adalah metode yang digunakan untuk ekstraksi lemak, dimana labu ekstraksi dirancang supaya pelarut melewati sampel tanpa merendam sampel. Prinsip metode goldfish adalah sampel yang telah dihaluskan, dimasukkan ke dalam thimble kemudian dipasang dalam tabung penyangga yang berlubang pada bagian bawah. Pelarut diletakkan dalam gelas piala yang terdapat di bawah tabung penyangga. Saat dipanaskan, pelarut naik

dan diinginkan oleh kondensor sehingga terdapat embun dan menetes pada sampel, sehingga bahan dibasahi oleh pelarut dan lemak terekstraksi yang kemudian akan tertampung dalam gelas piala kembali. Prosedur dan perhitungan analisis kadar abu adalah sebagai berikut:

- Ditimbang  $\pm 5$  g sampel kering dan halus serta dipindahkan ke dalam kertas saring kemudian dibungkus sampai sampel terbungkus.
- Pasanglah sampel pada sampel tube, yakni gelas penyangga yang bagian bawahnya terbuka tepat di bawah kondensor alat destilasi Goldfish.
- Dimasukkan pelarut (petroleum-ether) secukupnya ke dalam gelas piala.
- Pasanglah gelas piala berisi pelarut pada kondensor samapi tepat, dan tak dapat diputar lagi.
- Hidupkan aliran air pendingin dan kondensor.
- Naikkan pemanas listrik sampai menyentuh bagian bawah gelas piala dan nyalakan pemanas listriknya.
- Proses ekstraksi 3 – 4 jam.
- Setelah selesai ekstraksi, pemanas dimatikan dan diturunkan. Setelah sekiranya tidak ada tetesan pelarut. ambil thimble dan sisa dalam gelas penyangga.
- Kemudian residu yang ada dalam beaker glass yang dipasang dikeringkan dalam oven  $100^{\circ}\text{C}$  sampai berat konstan. Berat residu ini dinyatakan sebagai minyak atau lemak yang ada pada bahan.
- Kadar lemak dapat dihitung dengan rumus:

$$\% \text{ Lemak} = \frac{\text{berat gelas piala akhir-gelas piala awal}}{\text{berat sampel}} \times 100\%$$

### 3.4.3.3 Analisis Kadar Protein

Menurut Sudarmaji *et al.*, (2003) pada prinsipnya penentuan kadar protein dilakukan dengan metode Kjeldahl. Dimana dengan cara menghitung presentase Nitrogen (N) terlarut yang terkandung oleh suatu bahan pangan. Prosedur penentuan kadar protein dengan metode kjedahl sebagai berikut:

- Diambil bahan yang telah dihaluskan sebanyak 0,2 – 0,5 g dan dimasukkan kedalam labu kjedahl.
- Ditambah 15 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat dan 2 gr tablet kjedahl sebagai katalisator.
- Dipanaskan dalam ruang asam selama 2-3 jam pada suhu 370°C sampai jernih kehijauan.
- Setelah dingin ditambahkan akuades 100 mL dan 50 mL NaOH
- Dilakukan destilasi dan menampung destilasi dalam enlemeyer yang telah diberi 50 mL H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> dan 1 tetes indikator MO (*Metyl Orange*).
- Destilasi berakhir dan dilakukan titrasi dengan larutan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> N hingga warna merah muda tidak pudar.
- Kadar protein dapat dihitung dengan rumus:

$$\% \text{ Protein} = \frac{(\text{ml titrasi H}_2\text{SO}_4 - \text{mL blanko})}{\text{Berat sampel} \times 1000} \times N \text{ H}_2\text{SO}_4 \times 1,4007 \times 6,25$$

### 3.4.3.4 Analisis Kadar Abu

Menurut Sudarmadji *et al.*, (1989) analisis kadar abu adalah zat anorganik sisa hasil pembakaran suatu bahan organik. Prinsip analisis kadar abu adalah mengoksidasi zat organik pada suhu tinggi sekitar suhu 500-600°C kemudian melakukan penimbangan zat yang masih tertinggal setelah proses pembakaran.

Prosedur dan perhitungan analisis kadar abu adalah sebagai berikut:

- Ambil cawan yang digunakan terlebih dahulu dioven selama 30 menit pada suhu 100-105°C, kemudian didinginkan dalam desikator untuk menghilangkan uap air dn ditimbang sebagai beratnya.

- Sampel ditimbang sebanyak 2 g dalam cawan yang sudah dioven.
- Sampel dibakar diatas hot plate sampai tidak berasap.
- Dilakukan pengabuan sampel didalam muffle bersuhu 550-600°C sampai pengabuan sempurna. Lama pengabuan berbeda-beda dan berkisar antara 2-8 jam.
- Sampel yang sudah diabukan didinginkan dalam desikator dan ditimbang.
- Kadar abu dapat dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ Abu} = \frac{\text{berat kurs porselin akhir}-\text{berat porselin awan}}{\text{berat sampel}} \times 100\%$$

#### 3.4.3.5 Analisis Karbohidrat

Menurut Winarno (2004), Prinsip penentuan kadar karbohidrat dapat diketahui dengan cara menghitung selisih % total kadar air, kadar lemak, kadar abu dan kadar protein atau dengan cara perhitungan *Carbohydrate by Difference*.

$$\% \text{ Karbohidrat} = 100\% - \% \text{ kadar (air+lemak+protein+abu)}$$

#### 3.4.4 Nilai pH

Menurut Sudarmadji *et al.*, (1989) penetapan nilai pH dilakukan setelah pH meter dikalibrasi terlebih dahulu. Sampel sebanyak 1 mL ditambahkan dengan aquades perbandingan 1:10 (v:v), lalu dihomogenkan. Setelah itu, elektoda dibilas dengan menggunakan aquades dan dikeringkan. Elektroda dicelupkan ke dalam larutan sampel dan pengukuran pH dapat di set. Elektroda dibiarkan tercelup beberapa saat sampai diperoleh nilai pH yang stabil dan kemudian dicatat nilai pH sampel yang didapat.

### 3.4.5 Kapasitas Emulsi

Menurut Rieuwpassa *et al.*, (2013) Kapasitas emulsi yang baik bila bahan dapat menyerap air dan minyak secara seimbang. Prinsip dari kapasitas emulsi protein bergantung pada keseimbangan ikatan hidrofilik dan lipofilik. Kapasitas emulsi diukur dengan cara 5 g sampel ditambahkan dengan 20 mL akuades dan 20 mL minyak jagung, kemudian dihomogenkan selama 1 menit. Lalu disentrifus pada 7500 rpm selama 5 menit.

Prosedur pengujian kapasitas emulsi adalah sebagai berikut:

- Timbang sampel sebanyak 1 g.
- Tambahkan 5 mL air dan 5 mL minyak jagung.
- Homogenkan selama 1 menit dan disentrifus pada 7500 rpm selama 5 menit.
- Rumus kapasitas emulsi dapat dihitung dengan menggunakan rumus:

Kapasitas emulsi = (volume emulsi setelah disentrifuge / volume awal) x 100 %

### 3.4.6 Daya Buih

Buih merupakan bentuk dispersi koloida gas dalam cairan. Prinsip dari daya buih yaitu kekuatan protein dalam memerangkap gas, dimana kapasitas buih bergantung pada fleksibilitas molekul dan sifat fisiko kimia protein. Sampel sebanyak 1 g ditambahkan dengan 10 mL akuades dan dihomogenkan selama 1 menit. Kapasitas busa dilihat dari busa yang terbentuk dibandingkan dengan kapasitas volume awal. Stabilitas busa merupakan rasio dari kapasitas busa selama waktu observasi dibandingkan dengan kapasitas busa awal.

Prosedur Pengujian daya buih adalah sebagai berikut:

- Timbang sampel sebanyak 1 gram
- Tambahkan 10 mL air dan dihomogenisasi selama 1 menit.
- Campuran larutan sampel dipindahkan ke dalam 25 mL *beaker glass*.

- Kapasitas busa dilihat dari busa yang terbentuk dibandingkan dengan kapasitas volume awal. Stabilitas busa merupakan rasio dari kapasitas busa selama waktu observasi dibandingkan dengan kapasitas busa awal.

### 3.4.7 Analisis Profil Asam Amino

Kromatografi adalah suatu metode pemisahan yang berdasarkan pada perbedaan migrasi komponen-komponen antara dua fasa, yaitu fasa diam dan fasa gerak 2. Secara teori pemisahan kromatografi yang paling baik akan diperoleh, jika fasa diamnya mempunyai luas sebesar-besarnya, sehingga terjadi keseimbangan yang baik antar fasa. Kemudian untuk fasa geraknya adalah yang mampu bergerak dengan cepat sehingga terjadi difusi sekecil-kecilnya. Untuk memperoleh luas muka fasa diam yang luas, digunakan serbuk dengan ukuran mikro, kemudian untuk memperoleh laju yang tinggi dari fasa gerak melewati fasa diam dilakukan dengan tekanan yang tinggi. Persyaratan tersebut telah dapat dipenuhi oleh HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Pada sistem HPLC, fasa diam berupa serbuk berukuran  $\mu\text{m}$ , ditempatkan pada kolom secara mampat dengan diameter 0,5 cm dengan panjang 5 – 50 cm. Fasa gerak berupa cairan murni atau campuran ataupun larutan, untuk menggerakkan fasa gerak dengan tekanan tinggi digunakan pompa (Setiawan, 2011).

Analisis asam amino dilakukan dengan menggunakan HPLC. Prosedur analisis asam amino adalah sebagai berikut:

- a. Larutan Standar/ Larutan Baku
  - Dipipet 40  $\mu\text{l}$  Std mix asam amino
  - Ditambahkan 40  $\mu\text{l}$  internal standar AABA
  - Ditambahkan 920  $\mu\text{l}$  aquabidest
  - Dihomogenkan dengan vortex mixer
  - Diambil 10  $\mu\text{l}$  standar

- Ditambahkan 70 µl AccQ-Fluor Borate
- Dihomogenkan dengan vortex mixer
- Ditambahkan 20 µl reagent fluor A
- Dihomogenkan dengan vortex mixer dan didiamkan selama 1 menit
- Diinkubasi selama 10 menit pada suhu 55°C
- Disuntikkan pada HPLC

b. Larutan Sampel

- Ditimbang 0,1 gram sampel
- Ditambahkan 5 mL HCl 6 N dan dihomogenkan dengan vortex mixer
- Dihidrolisis selama 22 jam pada suhu 110°C
- Didinginkan dan pindahkan ke labu ukur 50 mL dan tambahkan aquabidest sampai tanda batas
- Disaring dengan filter 0,45 µm
- Dipipet 500 µl filtrate, 40 µm AABA dan ± 460 µl aquabidest
- Dipipet 10 µl larutan
- Ditambahkan 70 µl AccQ-Fluor Borate dan dihomogenkan dengan vortex mixer
- Ditambahkan 20 µl reagent fluor A, dihomogenkan dengan vortex mixer dan didiamkan selama 1 menit
- Diinkubasi selama 10 menit pada suhu 55°C
- Disuntikkan pada HPLC
- Perhitungan

$$\text{Asam amino (mg/ 100 g)} = \frac{(\text{area komponen}) \text{ sampel} \times \text{konsentrasi standar} \times \text{BM} \times \text{fp}}{\text{area AABBA} \times 1.000.000 \times \text{bobot sampel (g)} \times 1000} \times 100 \text{ g}$$

Area AABA

Kondisi alat HPLC saat berlangsungnya analisis asam amino sebagai berikut:

Kolom : AccQtag column (4,9 x 150 mm)

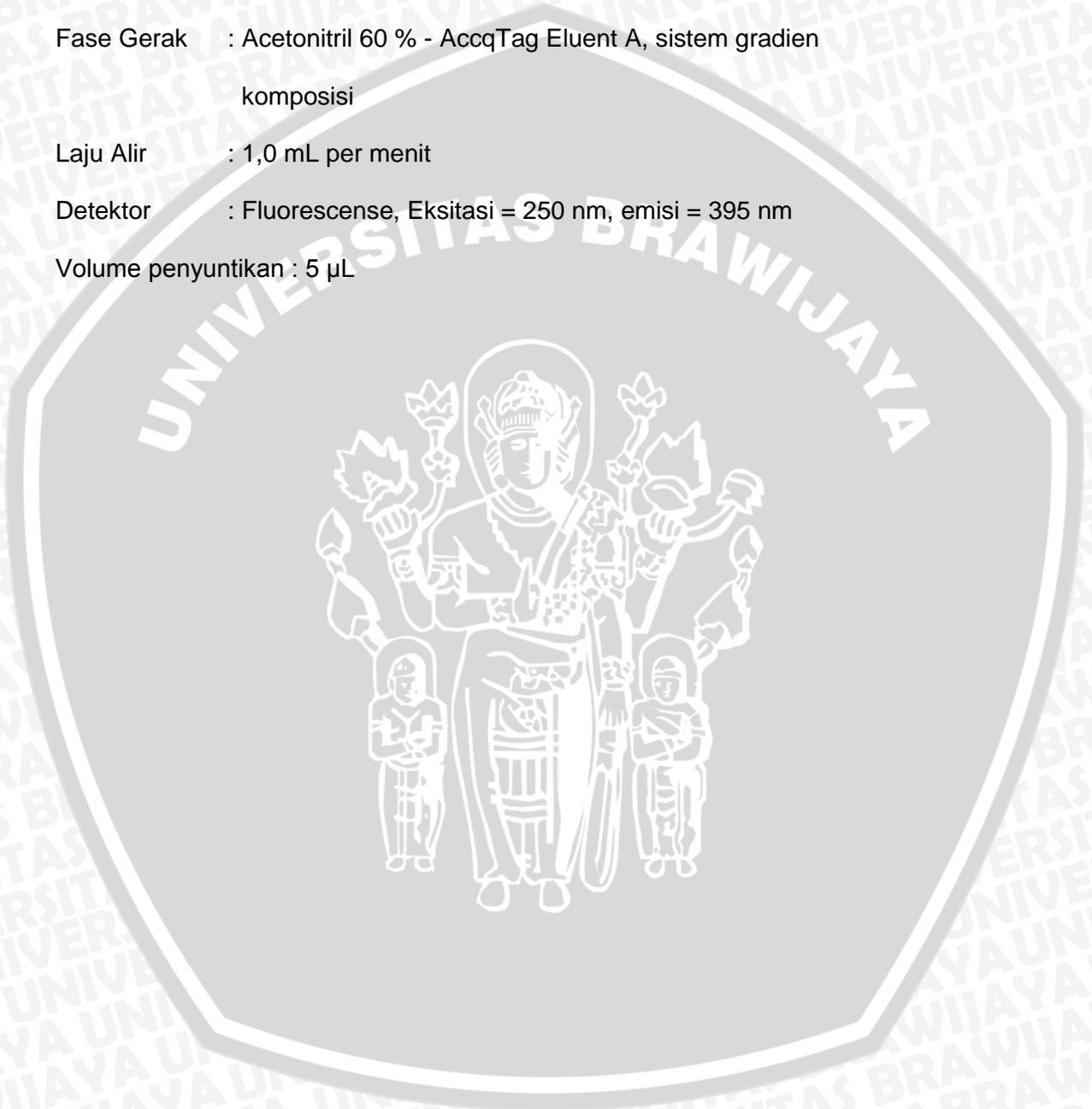
Temperature : 37°C

Fase Gerak : Acetonitril 60 % - AccqTag Eluent A, sistem gradien komposisi

Laju Alir : 1,0 mL per menit

Detektor : Fluorescence, Eksitasi = 250 nm, emisi = 395 nm

Volume penyuntikan : 5 µL



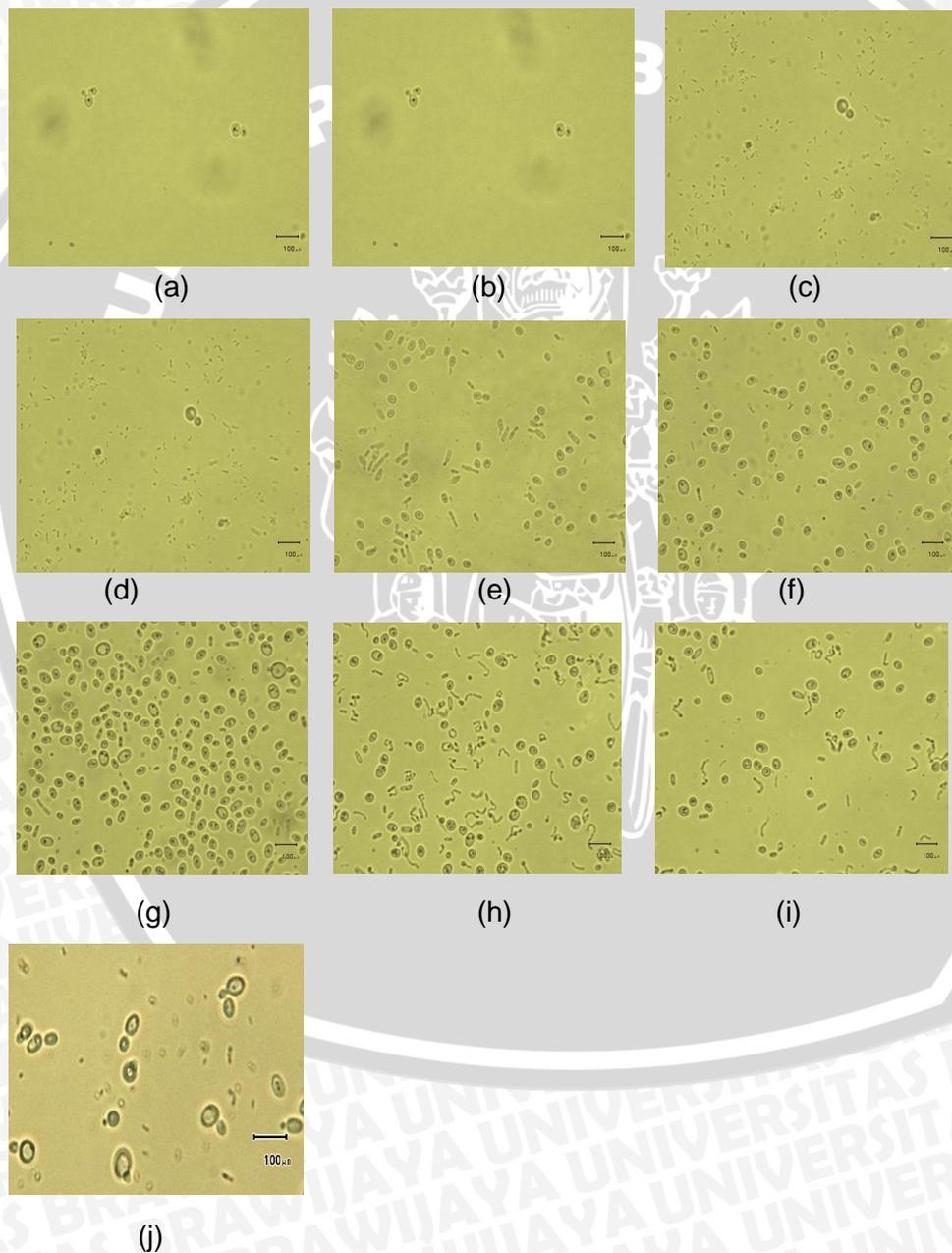
## 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Penelitian Pendahuluan

#### 4.1.1 Penentuan Fase Logaritmik

Berikut ini adalah sel-sel khamir laut yang telah mengalami pertumbuhan dan pembelahan selama masa pengamatan yang telah dilakukan setiap 12 jam sekali.

Sel-sel khamir laut ini dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Mikrograf kepadatan Khamir Laut pada Berbagai Lama Waktu Kultur dengan Pembesaran 1000x pada Jam ke-0 (a), Jam ke-12- (b), Jam ke-24 (c), Jam ke-36 (d), Jam ke-48 (e), Jam ke-60 (f), Jam ke-72 (g), Jam ke-84 (h), Jam ke-96 (i), dan Jam ke-108 (j).

Gambar 5 menunjukkan bahwa sel khamir laut telah mengalami pertumbuhan serta pembelahan selama masa pengamatan yang dilakukan setiap 12 jam. Gambar juga menunjukkan bahwa bentuk dari sel khamir laut yaitu bulat ovale dan terdapat tonjolan berukuran kecil yang menempel disampingnya. Hal tersebut menunjukkan bahwa sedang terjadi pertunasan. Flahuddin (2008) mengatakan bahwa khamir merupakan mikroorganisme bersel satu yang berukuran 5-20 mikron, bentuknya oval, atau bulat tak beraturan. Khamir dapat diisolasi dari manusia atau hewan berdarah panas, namun yang utama diisolasi dari tanah, air laut, produk fermentasi, hewan berdarah dingin dan sebagainya. Sel khamir memiliki beberapa organel seperti badan golgi, inti sel, mitokondria, dan vakuola sebagai tempat menyimpan cadangan nutrisi, sitoplasma, dinding sel yang mengandung glukukan dan manan yang terdiri atas lipid dan protein.

Fase pertumbuhan dari khamir laut dapat dilihat pada Gambar a. Pada Gambar (a) jam ke-0 dan Gambar (b) jam ke-12 mengalami peningkatan pada pertumbuhan sel khamir laut. Hal tersebut menunjukkan bahwa sel khamir laut menuju fase log pada jam ke 12. Sel khamir laut tidak mengalami fase adaptasi tetapi langsung mengalami pada fase log karena sel khamir laut mampu secara optimal dan efisien memanfaatkan pupuk yang ditambahkan pada kultur khamir laut sebagai sumber nitrogen sehingga tidak membutuhkan waktu yang lama untuk mengalami pertumbuhan (Sugoro, 2006).

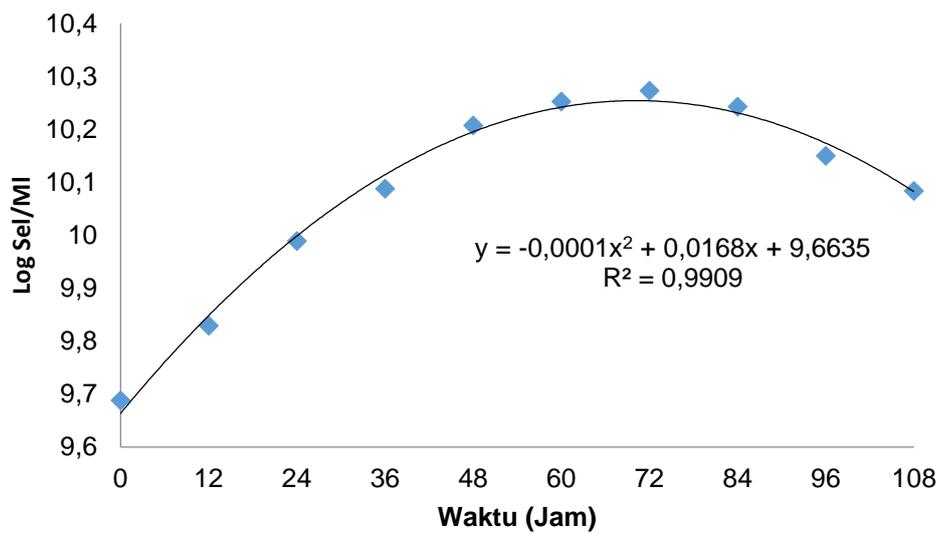
Pertumbuhan pada sel khamir laut terus mengalami peningkatan, hal ini dapat dilihat pada Gambar (b) jam ke-12 sampai jam ke-72 Gambar (g) terus mengalami peningkatan. Hal ini dapat dilihat dari perubahan pada sel khamir laut yang jumlah dan bentuknya semakin besar. Kemudian didukung juga dengan perhitungan kepadatan sel khamir laut dengan menggunakan *haemocytometer* pada mikroskop. Fase pada pertumbuhan sel khamir ini disebut dengan fase logaritmik, Fase logaritmik adalah fase dimana mikroba membelah dengan cepat

dan konstan dan pada fase ini kecepatan pertumbuhan sangat dipengaruhi oleh media tempat tumbuhnya seperti pH dan kandungan nutrisi, juga kondisi lingkungan termasuk suhu dan kelembapan udara (Yuliana, 2008). Fase pertumbuhan inilah yang digunakan pada penelitian utama di dalam proses pembuatan hidrolisat protein ikan keong segar.

Ukuran dan bentuk sel khamir dalam kultur yang sama dapat berbeda-beda karena adanya perbedaan umur, kondisi lingkungan selama pertumbuhannya serta perkembangan individu sel. Awalnya terjadi penipisan dinding sel yang diikuti dengan sitoplasma tersebut keluar, dan kemudian membesar. Lalu diisi dengan komponen nukleus dan sitoplasma yang berasal dari induknya, maka anak sel akan melepaskan induknya sehingga akan terbentuk tunas yang baru (Fardiaz, 1992).

Pada Gambar (h), (i) dan (j) menunjukkan bahwa pada masa pengkulturan jam ke-84, jam ke-96 dan jam ke-108, pertumbuhan sel khamir laut mengalami penurunan jumlah sel. Hal ini disebabkan karena berkurangnya ketersediaan nutrisi untuk pertumbuhan sel khamir laut yang dapat menyebabkan penurunan sel atau kematian. Kematian sel dapat disebabkan oleh habisnya jumlah nutrisi yang ada atau terjadinya penimbunan dari senyawa hasil metabolisme yang mengandung racun bagi pertumbuhan sel (Apriani, 2008).

Dari uraian yang ada di atas dapat dilihat juga dalam bentuk grafik pertumbuhan sel khamir laut mulai dari jam ke-0 sampai jam ke-108 dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6 . Grafik Pertumbuhan Sel Khamir Laut mulai dari jam ke-0 sampai jam ke-108 dengan pengamatan setiap 12 jam sekali.

Gambar 6 menunjukkan fase yang dialami khamir laut dari mulai jam ke-0 sampai jam ke-108 dengan pengamatan setiap 12 jam sekali, fase yang terjadi pada khamir laut diatas yaitu fase log, dimana fase ini mulai dari jam ke-0 sampai jam ke-72. Fase ini merupakan suatu keadaan dimana sel khamir dapat tumbuh dan membelah dengan cepat. Namun, untuk mengetahui lebih detail lagi dari fase pertumbuhan khamir laut ini yaitu dilakukan pengamatan setiap 2 jam sekali antara jam ke-0 sampai jam ke-12, kemudian didapatkan fase adaptasi atau fase lag yang terjadi pada jam ke-0 sampai jam ke-12. Kenapa memilih jam ke-72 untuk fase log karena pada jam tersebut khamir laut memiliki kualitas dan kuantitas yang sangat optimal, dimana pada jam tersebut biomassa sel meningkat serta kualitas dalam menghasilkan enzim untuk proses hidrolisis sangat baik.

#### 4.1.2 Penentuan Volume Molase dan Lama Waktu Fermentasi

Penentuan volume molase dalam pembuatan hidrolisat protein keong mas dengan molase yaitu bertujuan untuk menentukan volume molase yang optimal untuk dijadikan sebagai acuan didalam melakukan penelitian utama. Penentuan pemberian volume molase rebus didalam proses pembuatan hidrolisat protein

keong mas berdasarkan penelitian Bueno-Solano et al., (2008) mengatakan bahwa didalam penelitian tersebut menggunakan penambahan gula 10 mL dalam pembuatan hidrolisat protein keong mas, tetapi penelitian ini sebagai pengganti gula menggunakan molase untuk nutrisi pertumbuhan khamir laut.

Penentuan volume molase rebus dan lama fermentasi bertujuan sebagai landasan di dalam melakukan penelitian utama. Pada penelitian ini ada beberapa kali percobaan dengan jumlah bahan baku (keong mas segar 50 dan 100 g) yaitu percobaan pertama (volume molase rebus 10 mL, 20 mL dan 30 mL), dan percobaan kedua (volume molase rebus 40 mL, 50 mL dan 60 mL, dan percobaan ketiga (volume molase rebus 200 mL, 300 mL dan 400 mL).

Hasil dari percobaan pertama dengan volume molase rebus 10 mL, 20 mL dan 30 mL dengan menggunakan khamir laut sebanyak 10 mL, pada percobaan pembuatan hidrolisat protein keong mas ini fermentasi hanya dapat berlangsung selama 2 hari, didalam cairan hidrolisat protein keong terdapat aroma busuk, berbuih, dan tumbuh jamur, hal tersebut dimungkinkan karena kurangnya cairan pada sampel yang dapat menyebabkan sampel menjadi padat sehingga proses aerasi berjalan tidak sempurna. Menurut Edahwati (2009) Proses penambahan oksigen (aerasi) merupakan suatu usaha penambahan konsentrasi oksigen yang terkandung didalam air, agar proses oksidasi oleh mikroba dapat berjalan dengan baik.

Sedangkan pada percobaan yang kedua menggunakan volume molase 40 mL, 50 mL dan 60 mL dengan berat keong mas segar 50 g dan jumlah khamir 10 mL, produk dapat bertahan sampai kurang lebih 2 hari, setelah itu mengalami pembusukan, berjamur, berbuih dan volume molase berkurang, pada proses fermentasi menggunakan botol aqua kecil. Pada volume molase 60 mL dapat bertahan sampai 6 hari, masih memiliki bau khas fermentasi, dan berwarna coklat pekat, dimungkinkan karena pemberian volume molase lebih banyak sehingga

saat aerasi dapat berjalan dengan baik dan proses fermentasi dapat bertahan lebih lama.

Dari hasil percobaan kedua dengan menggunakan molase rebus 40 mL, 50 mL dan 60 mL dan menggunakan khamir laut sebanyak 20 mL. Pada percobaan kedua ini terdapat banyak buih, sehingga cairan hidrolisat protein keong sampai tumpah-tumpah keluar pada saat di aerasi, hal ini disebabkan karena masih banyaknya lendir yang ada pada daging keong mas, sehingga pada saat aerasi campuran dari daging keong mas, molase dan khamir laut banyak membentuk buih atau busa. Jadi pada proses pembuatan hidrolisat protein keong mas yang kedua ini dianggap gagal karena proses fermentasi hanya berlangsung selama 1 hari, kecuali pada volume molase 60 mL.

Pada percobaan ketiga menggunakan volume molase sebanyak 200 mL, 300 mL dan 400 mL, dengan menggunakan penambahan daging keong mas sebanyak 100 g dan khamir laut 20 mL. Dilakukan percobaan ketiga ini yaitu untuk menentukan batas bawah dalam penentuan volume molase serta lama fermentasi yang optimal agar dapat digunakan pada penelitian utama. Setelah dilakukan pengamatan hasil dari proses pembuatan hidrolisat protein keong mas dengan volume molase 200 mL, 300 mL dan 400 mL dapat bertahan sampai hari ke-12, dan tidak mengalami pembusukan, ataupun keluar buih pada cairan hidrolisat protein tersebut. Hal ini dapat dilihat dari kondisi cairan hidrolisat protein, seperti bau masih khas fermentasi.

Dari hasil percobaan yang ketiga ini volume molase yang sesuai dengan pembuatan hidrolisat protein keong mas yaitu dengan menggunakan volume molase 200 mL, 300 mL dan 400 mL dengan sampel daging keong mas segar sebanyak 100 g dan khamir laut sebanyak 20 mL. dengan lama fermentasi sampai 12 hari sehingga didapat acuan untuk melakukan penelitian utama. Tingginya

volume molase yang digunakan maka tekstur hidrolisat protein keong mas tidak terlalu padat dan memiliki warna coklat pekat serta aroma khas fermentasi.

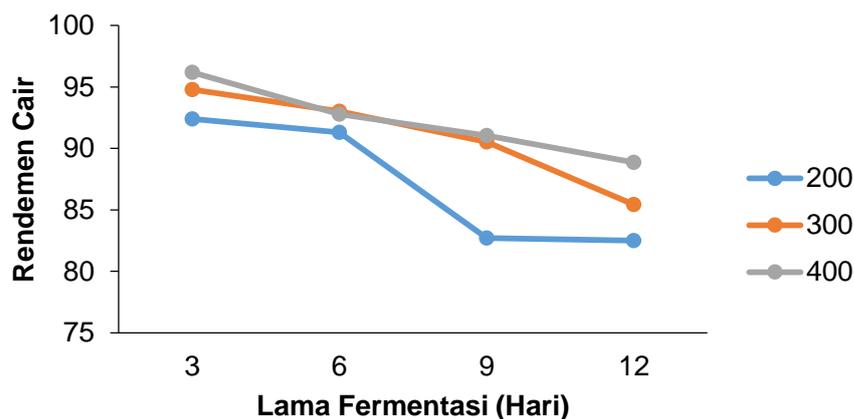
#### **4.1.3 Volume Khamir yang Optimal**

Penggunaan khamir laut digunakan sebagai landasan untuk melakukan penelitian utama dalam menambahkan khamir laut pada proses pembuatan hidrolisat protein keong mas segar. Percobaan dilakukan dengan menggunakan khamir laut 10 mL dan 20 mL, volume khamir laut yang ditambahkan merupakan hasil dari kultur khamir laut pada fase log, dengan bahan baku keong mas segar sebanyak 50 g dan 100 g.

Hasil dari percobaan volume khamir laut 10 mL menunjukkan bahwa hidrolisat protein keong mas segar dapat bertahan hingga fermentasi 2 hari, hal ini dimungkinkan karena volume molase yang digunakan sedikit sehingga sel khamir laut kekurangan nutrisi dan sumber karbon yang berasal dari molase. Sedangkan pada volume khamir laut 20 mL fermentasi dapat bertahan sampai 9 -12 hari, hal ini dikarenakan jumlah volume molase yang digunakan lebih banyak sehingga sel khamir laut tidak kekurangan nutrisi ataupun sumber karbon dari molase tersebut. Menurut Jannah (2012) Penambahan volume khamir laut memiliki batas maksimum dan apabila melebihi dapat menyebabkan khamir laut jenuh terhadap substrat sehingga tidak dapat menghidrolisis dengan baik.

#### **4.1.4 Pengukuran Rendemen Hidrolisat Protein Keong Mas**

Rendemen yang dihasilkan pada penelitian pendahuluan dari hidrolisat protein keong mas segar dengan penambahan molase rebus dan lama fermentasi yang berbeda dengan menggunakan 10 mL khamir dapat dilihat pada Gambar 7.

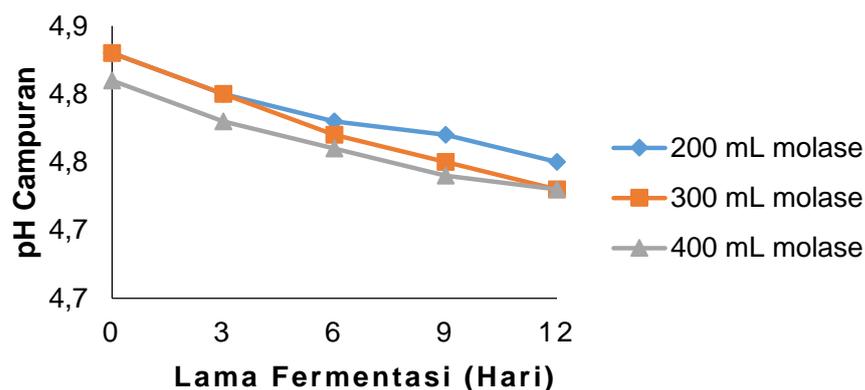


Gambar 7. Rendemen Cairan Hidrolisat Protein Keong Mas Segar dengan Lama Fermentasi yang Berbeda

Gambar 7 memperlihatkan bahwa semakin lama fermentasi maka rendemen cairan hidrolisat protein keong mas semakin menurun. Hal ini dimungkinkan karena semakin lama fermentasi menyebabkan semakin banyak senyawa volatil yang turun. Budy (2014) melaporkan bahwa aktivitas hidrolisis yang tinggi menyebabkan terurainya protein menjadi asam amino yang kemudian berubah menjadi  $H_2O$ ,  $CO_2$ , dan senyawa-senyawa yang mengandung nitrogen ( $NH_3$ , skatol, indol, kadaverin, dan putresin). Semakin lama fermentasi akan berpotensi terjadinya penguapan senyawa-senyawa volatil sehingga nilai rendemen cairan akan mengalami penurunan.

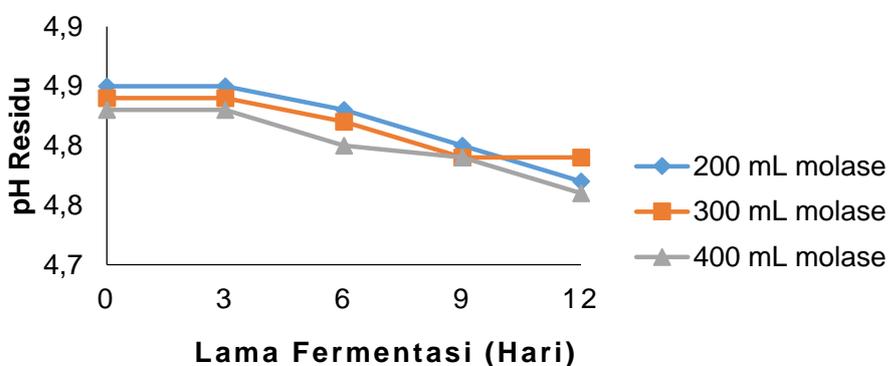
#### 4.1.5 Pengukuran pH Hidrolisat Protein Keong Mas

pH yang dihasilkan pada penelitian pendahuluan dari hidrolisat protein keong mas segar dengan penambahan molase rebus dan lama fermentasi yang berbeda dengan menggunakan 20 mL khamir laut dapat dilihat pada Gambar 8, 9 dan 10.



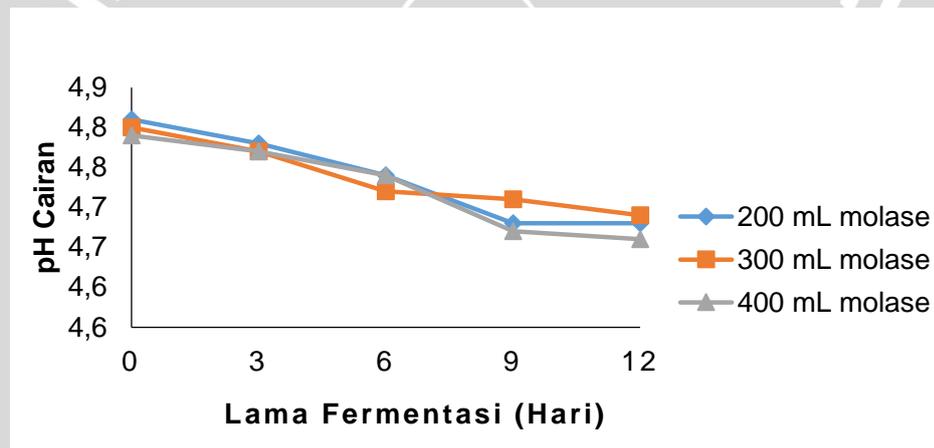
Gambar 8. pH Campuran Ampas dan Cairan Hidrolisat Protein Keong Mas Segar dengan Penambahan Molase Rebus dan Lama Fermentasi yang Berbeda

Gambar 8 menunjukkan bahwa pH pada campuran antara cairan dan ampas hasil hidrolisat protein keong mas segar dengan lama fermentasi yang berbeda mengalami penurunan. pH campuran untuk volume 200 mL tidak terlalu mengalami penurunan yang drastis yaitu 4,83-4,75. pH campuran untuk volume 300 mL berkisar yaitu antara pH 4,83-4,73. Kemudian untuk volume 400 mL berkisar antara pH 4,81-4,73. pH yang didapat pada proses fermentasi ini menunjukkan bahwa fermentasi dapat berjalan dengan baik. Eka (2002) melaporkan bahwa Khamir laut dapat optimal pada pH 4,0-4,5 dan khamir dapat tumbuh dengan baik pada suasana aerob namun untuk khamir fermentatif dapat tumbuh pada suasana anaerob.



Gambar 9. pH Residu Hidrolisat Protein Keong Mas Segar dengan Penambahan Molase dan Lama Fermentasi yang Berbeda

Gambar 9 menunjukkan bahwa pH ampas hasil dari hidrolisis protein keong mas segar dengan penambahan volume molase mengalami penurunan. pH ampas untuk volume 200 mL berkisar antara pH 4,85-4,77. pH ampas untuk volume 300 mL berkisar antara pH 4,84-4,79. Sedangkan pH ampas untuk volume 400 mL berkisar antara pH 4,83-4,76. Hal ini dapat dimungkinkan karena khamir dapat menghasilkan produk sampingan metabolisme dan dikeluarkan ke dalam larutan fermentasi sehingga residunya tidak menghasilkan perubahan pH yang terlalu banyak. Kristianawati, (2014) melaporkan bahwa menurunnya nilai pH dikarenakan dengan adanya enzim, maka semakin tinggi enzim maka semakin tinggi derajat hidrolisis yang terjadi dan menghasilkan senyawa yang bersifat asam.



Gambar 10. pH Cairan Hidrolisat Protein Keong Mas Segar dengan Penambahan Molase dan Lama Fermentasi yang Berbeda

Gambar 10 menunjukkan bahwa pH cairan hidrolisat protein keong mas segar dengan penambahan volume molase dan lama fermentasi yang berbeda mengalami penurunan. pH cairan untuk volume 200 berkisar antara pH 4,81-4,68. pH cairan untuk volume 300 berkisar antara pH 4,8-4,69. pH cairan untuk volume 400 berkisar antara pH 4,79-4,66. Wicaksana, (2014) menambahkan bahwa menurunnya kadar pH diakibatkan adanya aktivitas bakteri penghasil asam termasuk bakteri asam laktat yang berlangsung selama proses fermentasi selain starter yang ditambahkan.

## 4.2 Penelitian Utama

Berdasarkan hasil penelitian pendahuluan diketahui bahwa proses pembuatan hidrolisat protein keong mas (*Pomacea canaliculata*) dilakukan penambahan molase rebus dengan volume dari 100 mL, 200 mL, dan 300 mL dinaikkan menjadi 200 mL, 300 mL dan 400 mL dan lama waktu fermentasi yang digunakan yaitu 0 hari (kontrol), 3 hari, 6 hari, 9 hari dan 12 hari. Sedangkan untuk penambahan inokuan khamir laut sebanyak 20 mL dengan kepadatan  $48,1 \times 10^1$  sel logaritmik. Selanjutnya variabel yang diperoleh dari landasan dalam pembuatan hidrolisat protein keong mas (*Pomacea canaliculata*) pada penelitian utama. Produk hidrolisat protein keong mas (*Pomacea canaliculata*) ini digunakan sebagai suplemen pangan ataupun pakan, maka akan dilakukan analisa terhadap produk hidrolisat protein tersebut meliputi analisa proksimat seperti (kadar air, kadar lemak, kadar abu, kadar protein dan kadar karbohidrat), uji total asam amino, uji pH, uji daya buih dan uji emulsi.

### 4.2.1 Komposisi Kimia Keong Mas Segar

Komposisi kimia keong mas segar memiliki komposisi yang berbeda dan bervariasi antar individu. Hal ini dikarenakan faktor habitat, makanan, spesies, musim dan umur dari keong mas segar, dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1 memperlihatkan bahwa kadar air keong mas segar lebih tinggi dibandingkan kadar air keong mas rebus lebih rendah dari pada keong mas segar. Hal ini dimungkinkan karena perebusan dapat mengurangi kadar air yang terdapat pada keong mas segar. Menurut Ardiansari (2012), perebusan adalah proses pemasakan dengan menggunakan suhu panas ( $\pm 100^\circ\text{C}$ ), dan termasuk dalam kategori pemanasan basah karena menggunakan media air. Ditambahkan oleh Winarno (2004), perebusan dapat mengurangi daya tarik menarik antara molekul-molekul air, sehingga terjadi perpindahan air dari terikat menjadi air bebas dimana air bebas akan lebih mudah menguap apabila dipanaskan.

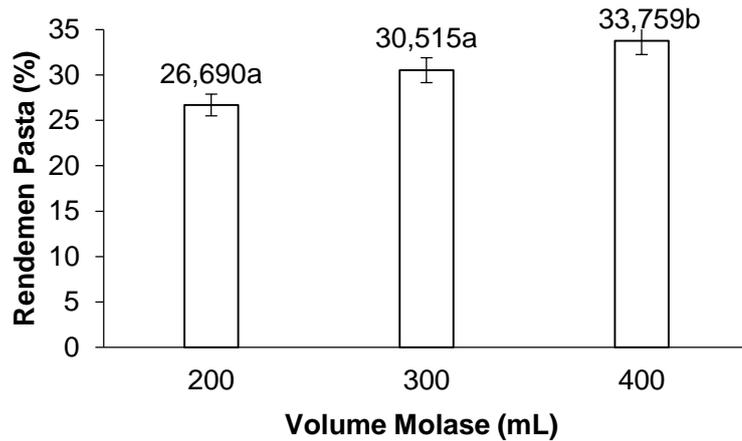
Tabel 1 juga memperlihatkan bahwa kadar lemak dan kadar abu keong mas segar lebih tinggi daripada keong mas rebus. Hal ini dapat disebabkan karena perbedaan kondisi bahan baku yang digunakan. Selain itu juga dapat disebabkan oleh faktor seperti habitat, spesies, musim, umur dan makanannya. Winarso (2003) menyatakan bahwa terjadinya keseimbangan massa dimana kadar air berbanding terbalik dengan kadar abu dan kadar lemak.

Tabel 1 memperlihatkan bahwa kadar protein keong mas segar lebih tinggi daripada keong mas rebus. Hal ini dapat dimungkinkan pada proses perebusan dapat menyebabkan protein terdenaturasi. Kusnandar (2010) menyatakan bahwa Denaturasi protein dapat disebabkan oleh proses pemanasan, Pemanasan pada suhu 55-75°C umumnya dapat menyebabkan protein terdenaturasi, selain itu pemanasan juga dapat menyebabkan perubahan struktur tersier pada protein, tetapi tidak merubah susunan asam aminonya.

#### **4.2.2 Rendemen Hidrolisat Protein Keong Mas Segar**

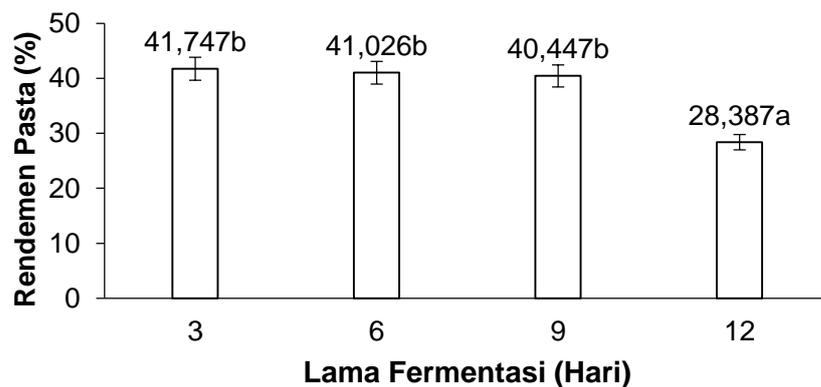
##### **a. Rendemen Pasta**

Data pengamatan dan analisis data rendemen pasta hidrolisat protein keong mas segar dengan volume molase rebus dan lama fermentasi yang berbeda dapat dilihat pada Lampiran 11. Hasil analisis data menunjukkan bahwa interaksi volume molase rebus dan lama fermentasi terhadap rendemen pasta berpengaruh nyata ( $p < 0,05$ ) terhadap rendemen pasta hidrolisat protein keong mas segar. Rata-rata rendemen pasta hidrolisat protein keong mas segar dengan volume molase rebus dan lama fermentasi yang berbeda dapat dilihat pada Gambar 11 dan 12.



Gambar 11. Rata- Rata Rendemen Pasta Hidrolisat Protein Keong Mas Segar dengan Penambahan Volume Molase yang Berbeda

Gambar 11 menunjukkan bahwa penambahan volume molase dapat meningkatkan rendemen pasta hidrolisat protein keong mas. Hal ini dimungkinkan karena semakin banyak cairan molase yang ditambahkan pada hidrolisat protein maka enzim dapat dengan mudah untuk menghidrolisis. Pada saat hidrolisis tersebut nilai kecepatan hidrolisis dipengaruhi oleh volume substrat, baik berasal dari kepadatan maupun tekstur serta dari volume enzim, pH dan suhu yang telah digunakan (Purbasari, 2008).



Gambar 12. Rata- Rata Rendemen Pasta Hidrolisat Protein Keong Mas Segar dengan Lama Fermentasi yang Berbeda

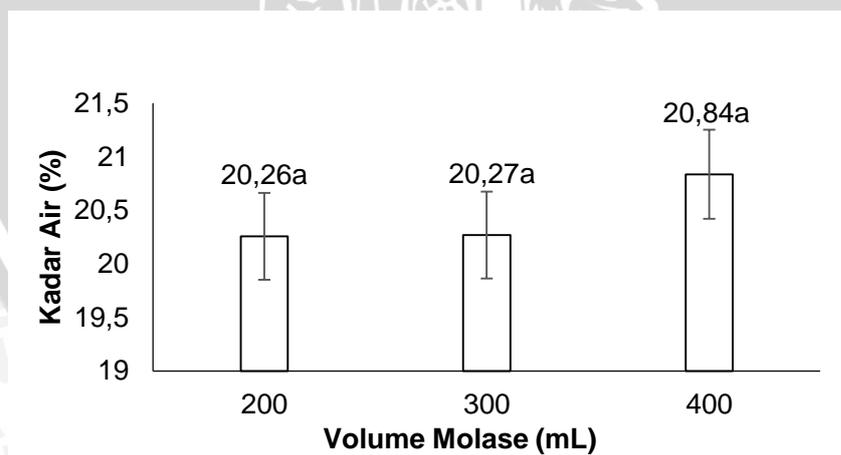
Gambar 12 menunjukkan bahwa terjadi penurunan pada hidrolisat protein keong mas segar dengan lama fermentasi yang berbeda. Hal ini dimungkinkan

karena pada proses pengeringan untuk mendapatkan rendemen pasta dapat mengakibatkan komponen air akan berkurang dan meningkatkan komponen lain seperti protein, lemak, dan abu. Hidayat (2005) melaporkan bahwa pengeringan pada suatu produk hidrolisat hanya bertujuan untuk menghilangkan kandungan air. Hal ini yang dapat menyebabkan rendemen pasta hidrolisat protein lebih rendah dibandingkan dengan rendemen cairan hidrolisat protein keong segar.

#### 4.2.3 Analisis Proksimat Hidrolisat Protein Keong Mas Segar

##### a. Kadar Air

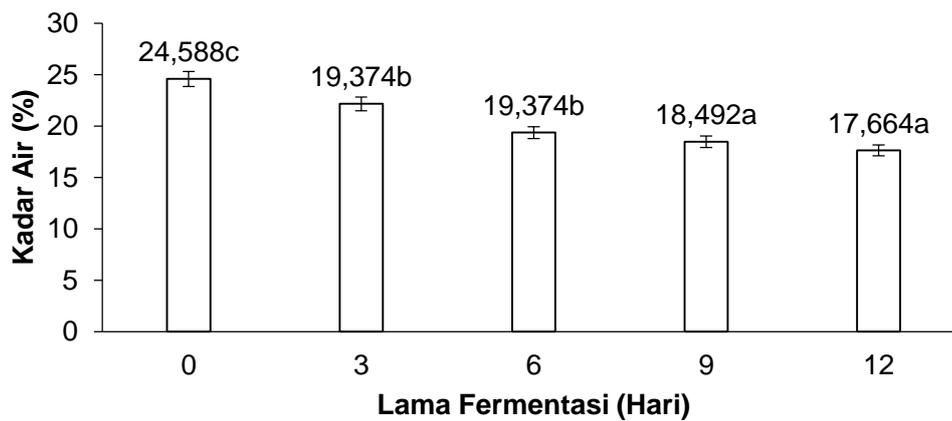
Data pengamatan dan analisis data kadar air kontrol atau fermentasi 0 hari dan kadar air pasta hidrolisat protein keong mas segar dengan penambahan volume molase rebus dan lama fermentasi yang berbeda dapat dilihat pada Lampiran 12. Hasil analisis data menunjukkan bahwa antar lama fermentasi dan volume molase memberikan pengaruh yang nyata ( $p < 0,05$ ) terhadap kadar air pasta hidrolisat protein keong mas segar. Rata-rata kadar air kontrol dan pasta hidrolisat protein keong mas dengan penambahan volume rebusa dan lama fermentasi yang berbeda dapat dilihat pada Gambar 13 dan 14.



Gambar 13. Rata- Rata Kadar Air Pasta Hidrolisat Protein Keong Mas Segar dengan Penambahan Volume Molase yang Berbeda

Gambar 13 menunjukkan bahwa semakin banyak volume molase yang ditambahkan, maka kadar air pasta hidrolisat protein keong mas semakin

meningkat. Hal ini dimungkinkan karena tingginya kadar air pada molase yaitu 17-25% (Yuniasari, 2009). Budy (2014) melaporkan bahwa peningkatan jumlah molase dapat meningkatkan kadar air. Hal ini menunjukkan bahwa semakin banyak volume molase yang ditambahkan maka semakin banyak cairan hidrolisat protein keong mas segar yang dihasilkan. Pada saat khamir laut menghidrolisis substrat maka khamir laut akan menghasilkan air dari proses metabolisme (Rahmadi, 2003).

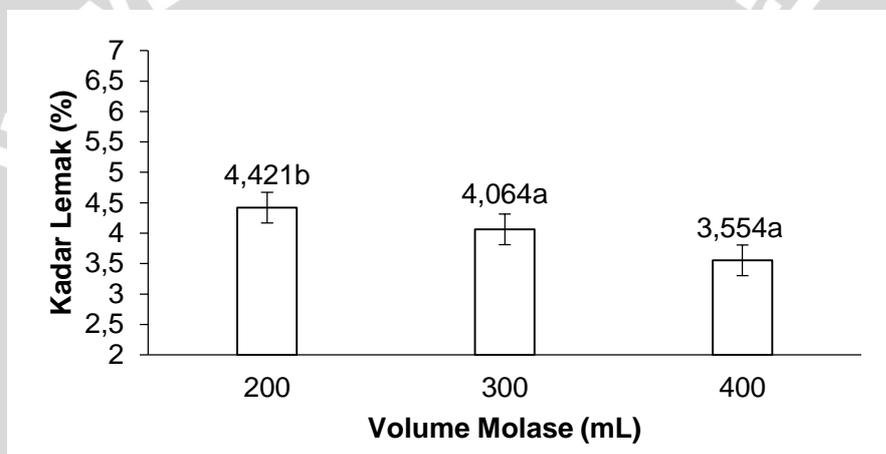


Gambar 14. Rata- Rata Kadar Air Pasta Hidrolisat Protein Keong Mas Segar dengan Lama Fermentasi yang Berbeda

Gambar 14 menunjukkan bahwa semakin lama fermentasi maka akan menurunkan kadar air pasta hidrolisat protein keong mas. Hal ini dimungkinkan karena selama hidrolisis akan menyebabkan semakin banyak molekul-molekul air yang dibebaskan. Budy (2014) melaporkan bahwa semakin lama fermentasi maka kadar air akan semakin turun. Hal ini menunjukkan bahwa pada saat fermentasi akan terjadi hidrolisis keong mas segar oleh khamir laut menjadi senyawa yang lebih sederhana yang disertai dengan pelepasan kadar air. Hidrolisis keong mas segar oleh khamir laut menyebabkan menurunnya kemampuan bahan dalam mempertahankan air akibat kehilangan gugus hidroksil. Sudarminto (2014) menambahkan bahwa terlepasnya gugus hidroksil menyebabkan semakin banyak jumlah air terikat yang terbebaskan sehingga air pada hidrolisat protein keong mas segar akan mudah menguap selama pengeringan.

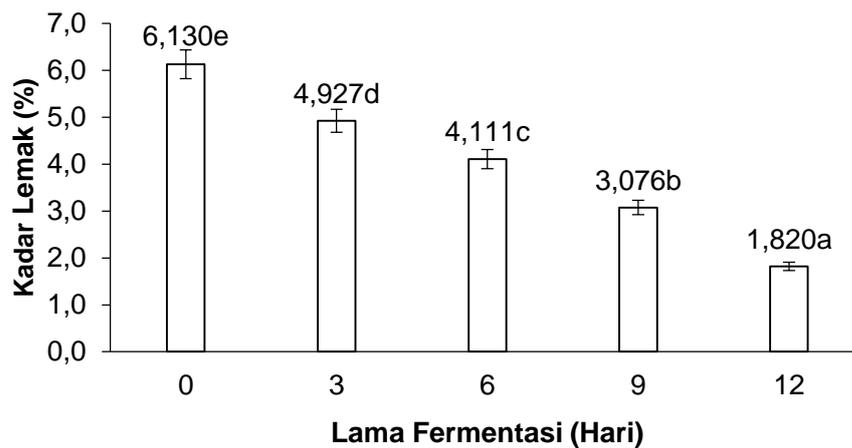
### b. Kadar Lemak

Data pengamatan dan analisis data kadar lemak kontrol atau fermentasi 0 hari dan kadar lemak pasta hidrolisat rotein keong mas segar dengan penambahan volume molase rebus dan lama fermentasi yang berbeda dapat dilihat pada lampiran 14. Hasil analisis data menunjukkan bahwa antar lama fermentasi dan volume molase memberikan pengaruh yang nyata ( $p < 0,05$ ) terhadap kadar lemak pasta hidrolisat protein keong mas segar . Rata- rata kadar lemak kontrol dan pasta hidrolisat protein keong mas segar dengan penambahan volume molase dan lama fermetasi yang berbeda dapat dilihat pada Gambar 15 dan 16.



Gambar 15. Rata-Rata Kadar Lemak Pasta Hidrolisat Protein Keong Mas Segar dengan Volume Molase yang Berbeda

Gambar 15 memperlihatkan bahwa peningkatan volume molase rebus dapat menurunkan kadar lemak pasta hidrolisat protein keong mas. Hal ini dimungkinkan karena adanya aktifitas khamir yang dapat merombak lemak menjadi senyawa yang lebih sederhana yaitu berupa gliserol dan asam lemak bebas sehingga dapat menurunkan kadar lemak. Enzim lipase akan memecah lemak menjadi asam lemak bebas dan gliserol. Lemak yang sudah terdegradasi akan menjadi asam lemak rantai pendek yang mudah menguap sehingga menyebabkan kadar lemak menurun (Sari, 2015).

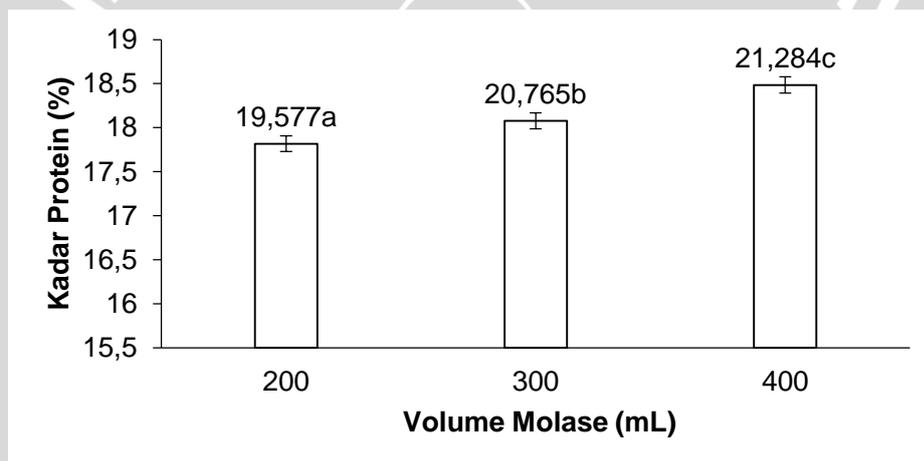


Gambar 16. Rata-Rata Kadar Lemak Pasta Hidrolisat Protein Keong Mas Segar dengan Lama Fermentasi yang Berbeda

Gambar 16 memperlihatkan bahwa adanya interaksi antara volume molase rebus dan lama fermentasi dapat menyebabkan kadar lemak mengalami penurunan. Hal ini dimungkinkan karena sumber lemak yang berasal dari bahan baku keong mas segar memiliki kandungan lemak yang relatif rendah. Dewi (2012) kandungan lemak pada keong mas segar adalah 0,99%. Purbasari (2008), menambahkan bahwa penurunan kadar lemak pada hidrolisat protein disebabkan pada saat proses hidrolisis enzimatis terjadi perubahan struktur jaringan yang sangat cepat. Karena protein myofbril banyak berkurang selama proses hidrolisis. Pada saat proses hidrolisis membran ini cenderung berkumpul dan membentuk gelembung yang tidak larut, sehingga dapat menyebabkan hilangnya membran lipid. Produk hidrolisat protein keong mas segar dengan kadar lemak rendah umumnya lebih stabil dan tahan lama tinggi jika dibandingkan dengan produk hidrolisat yang mempunyai kadar lemak tinggi.

### c. Kadar Protein

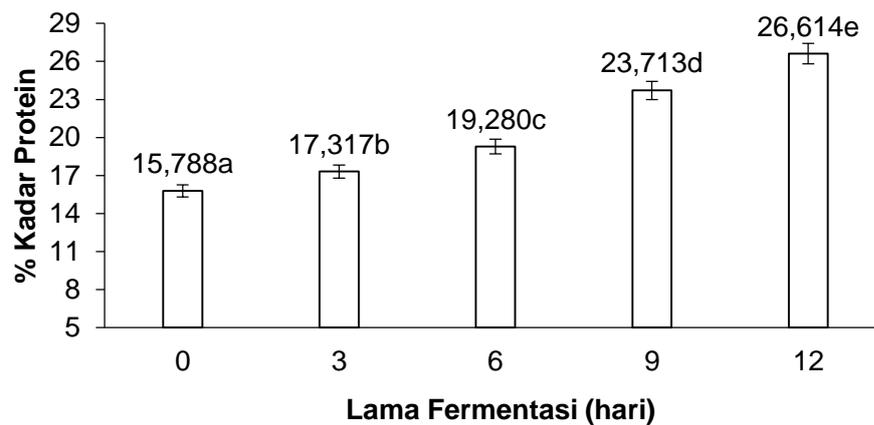
Data pengamatan dan analisis data kadar protein kontrol atau fermentasi 0 hari dan kadar protein pasta hidrolisat protein keong mas segar dengan penambahan volume molase rebus dan lama fermentasi yang berbeda dapat dilihat pada Lampiran 14. Hasil analisis data menunjukkan bahwa antar lama fermentasi dan volume molase memberikan pengaruh yang nyata ( $p < 0,05$ ) terhadap kadar protein pasta hidrolisat protein keong mas segar. Rata-rata kadar protein kontrol dan pasta hidrolisat protein keong mas segar dengan penambahan molase rebus dan lama fermentasi yang berbeda dapat dilihat pada Gambar 17 dan 18.



Gambar 17. Rata- Rata Kadar Protein Pasta Hidrolisat Protein Keong Mas Segar dengan Volume Molase yang Berbeda

Gambar 17 memperlihatkan bahwa peningkatan volume molase dapat meningkatkan kadar protein pasta hidrolisat protein keong mas segar. Hal ini dimungkinkan karena adanya peningkatan volume molase akan memacu pertumbuhan khamir laut, khamir laut merupakan protein sel tunggal. Selain itu adanya molase yang digunakan sebagai substrat pertumbuhan khamir, juga dapat memicu menghasilkan metabolit berupa enzim protease untuk menghidrolisis protein dari keong mas segar. Semakin banyak volume molase yang ditambahkan maka aktivitas dari khamir laut akan semakin meningkat dan semakin meningkat

pula enzim yang dihasilkan oleh khamir laut. Sukoso (2010), menyatakan bahwa khamir laut dapat menghasilkan enzim antara lain proteinase, amilase, deaminase, sukrose, maltose, fosfolipase dan fosfatase. Nurul *et al.*, (2012) menambahkan bahwa penambahan molase sebagai sumber energi mikroba sehingga mikroba berkembang lebih banyak dalam proses fermentasi dan dengan bertambahnya mikroba maka akan bermanfaat sebagai penyumbang protein kasar.

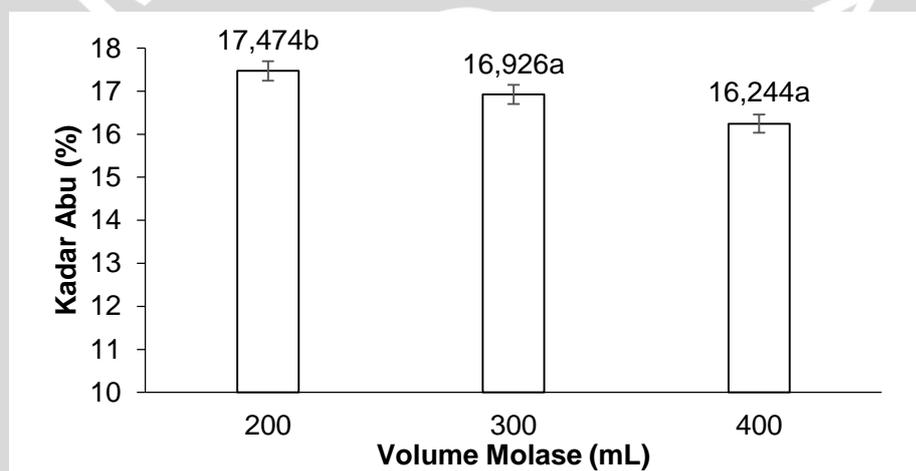


Gambar 18. Rata- Rata Kadar Protein Pasta Hidrolisat Protein Keong Mas Segar dengan Lama Fermentasi yang Berbeda

Gambar 18 memperlihatkan bahwa semakin lama fermentasi maka dapat meningkatkan kadar protein pasta hidrolisat protein keong mas segar. Hal ini sesuai dengan penelitian (Budy, 2014) yaitu adanya proses hidrolisis yang dapat meningkatkan kadar protein pada hidrolisat protein akibat pemecahan protein menjadi asam amino. Kurniawan (2012) melaporkan bahwa selama hidrolisis terjadi konversi protein yang bersifat tidak larut menjadi senyawa nitrogen yang bersifat larut, selanjutnya terurai menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana, seperti peptida-peptida, asam amino dan amonia. Konsentrasi enzim proteolitik yang semakin meningkat dalam proses hidrolisis akan menyebabkan peningkatan kandungan nitrogen terlarut dalam hidrolisat protein keong mas.

#### d. Kadar Abu

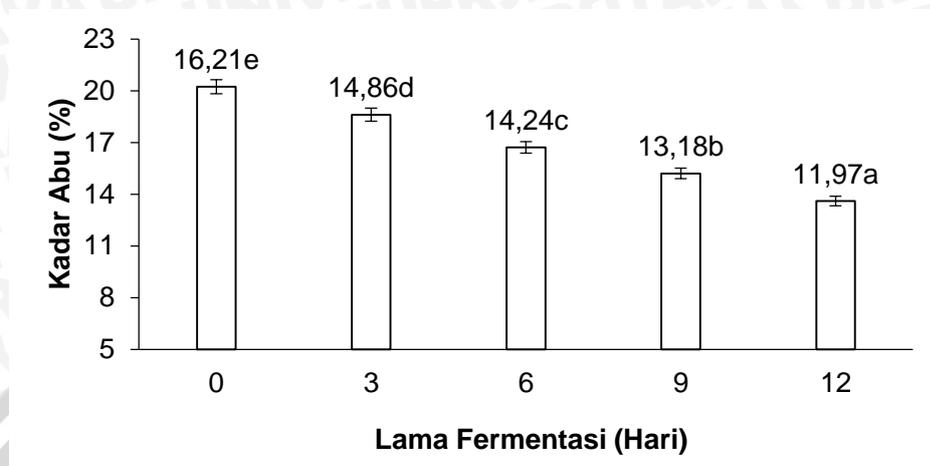
Data pengamatan dan analisis data kadar abu kontrol atau fermentasi 0 hari, dan kadar abu pasta hidrolisat protein keong mas segar dengan penambahan volume molase rebus dan lama fermentasi yang berbeda dapat dilihat pada Lampiran 15. Hasil analisis data menunjukkan bahwa antar lama fermentasi dan volume molase rebus memberikan pengaruh yang nyata ( $p < 0,05$ ) terhadap kadar abu pasta hidrolisat protein keong mas segar. Rata-rata kadar abu dan pasta hidrolisat protein keong mas segar dengan penambahan volume molase dan lama fermentasi yang berbeda dapat dilihat pada Gambar 19 dan 20.



Gambar 19. Rata-Rata Kadar Abu Pasta Hidrolisat Protein Keong Mas Segar dengan Volume Molase yang Berbeda

Gambar 19 memperlihatkan bahwa peningkatan volume molase dapat menurunkan kadar abu pasta hidrolisat protein keong mas segar. Hal ini dapat dimungkinkan karena adanya pemanfaatan mineral pada substrat untuk pertumbuhan dan perkembangan khamir laut, sehingga peningkatan volume molase dapat menurunkan kadar abu. Wiratno, (2008) melaporkan bahwa makanan utama bagi pertumbuhan mikroorganisme adalah molase yang berperan penting terhadap pertumbuhan khamir yaitu sebagai sumber nutrisi, mineral dan sumber karbon. (Sari, 2015) menambahkan bahwa Mineral merupakan salah satu

sumber pelengkap nutrisi bagi proses metabolisme mikroorganisme agar proses fermentasi dapat berlangsung dengan baik.



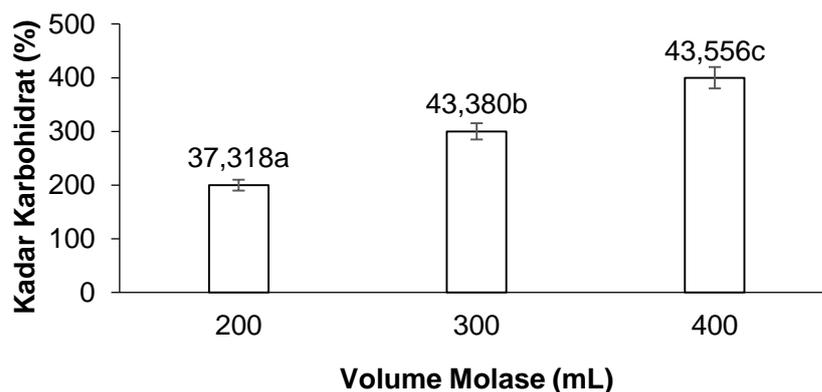
Gambar 20. Rata- Rata Kadar Abu Pasta Hidrolisat Protein Keong Mas Segar dengan Lama Fermentasi yang Berbeda

Gambar 20 menunjukkan bahwa adanya interaksi antara lama fermentasi dan volume molase pada hidrolisat protein keong mas. Perbedaan lama fermentasi dapat menurunkan kadar abu hidrolisat protein keong mas. Hal ini dapat diperkuat dengan adanya penjelasan bahwa kadar abu dapat mengalami penurunan yang disebabkan oleh adanya peningkatan bahan organik yang terbentuk dari hasil fermentasi, fermentasi diubah menjadi bentuk komponen organik (Rahmadi, 2003). Pada molase terdapat kandungan senyawa organik seperti gula, sakarosa, glukosa, fruktosa, dan senyawa nitrogen, selain itu juga mengandung senyawa anorganik seperti ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{K}_2\text{O}$ ,  $\text{CaO}$ ,  $\text{MgO}$ ,  $\text{P}_2\text{O}_5$ ,  $\text{Na}_2\text{O}$ ,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  dan  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (Widyanti, 2010).

#### e. Kadar Karbohidrat

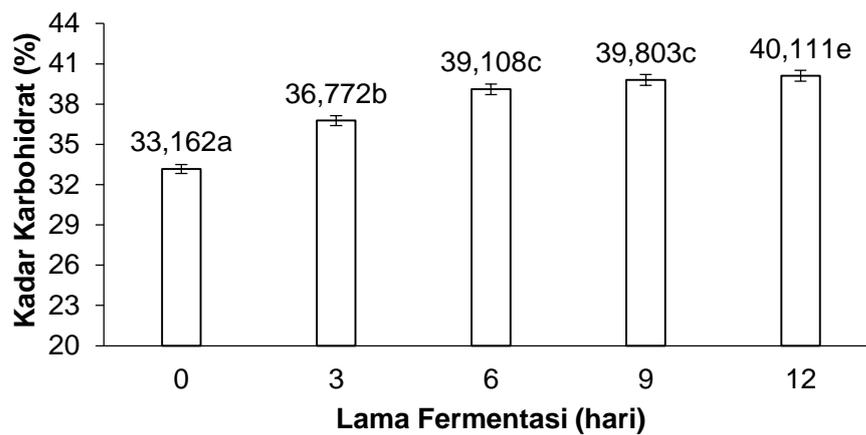
Data pengamatan dan analisis data kadar karbohidrat kontrol atau fermentasi 0 hari dan kadar karbohidrat pada pasta hidrolisat protein keong mas segar adalah dengan penambahan volume molase rebus dan lama fermentasi yang berbeda dapat dilihat pada Lampiran 16 . Hasil analisis data menunjukkan

bahwa antar lama fermentasi memberikan pengaruh yang nyata ( $p < 0,05$ ) terhadap kadar karbohidrat pasta hidrolisat protein keong mas segar. Rata-rata kadar karbohidrat kontrol dan pasta hidrolisat protein keong mas segar dengan penambahan volume molase rebus dan lama fermentasi yang berbeda dapat dilihat pada Gambar 21 dan 22.



Gambar 21. Rata-Rata Kadar Karbohidrat Pasta Hidrolisat Protein Keong Mas Segar dengan Volume Molase yang berbeda

Gambar 21 memperlihatkan bahwa peningkatan volume molase rebus dapat meningkatkan kadar karbohidrat pada hidrolisat protein keong mas segar. Hal ini dapat dimungkinkan karena molase yang ditambahkan mengandung karbohidrat tinggi yang disukai oleh khamir laut, sehingga penambahan molase sangat berpengaruh didalam produk hidrolisat protein keong mas. Simanjuntak (2009) melaporkan bahwa karbohidrat merupakan sumber karbon yang paling banyak digunakan dalam fermentasi oleh khamir. Fauzi (2009) menambahkan bahwa molase mengandung 2-5% karbohidrat. Sehingga peningkatan volume molase akan diimbangi dengan peningkatan kadar karbohidrat.

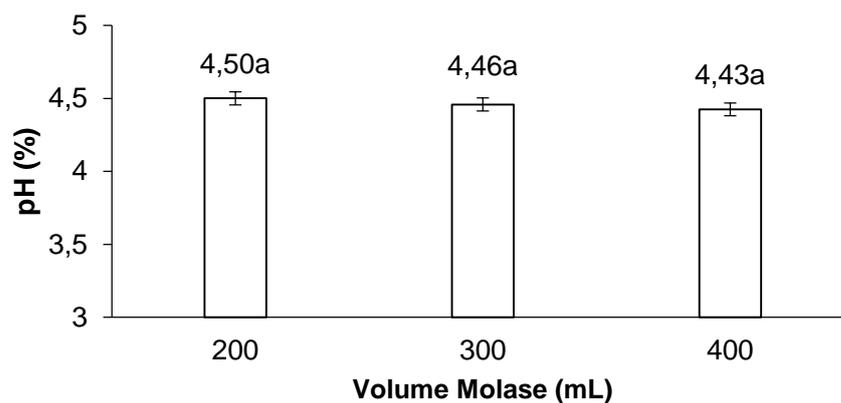


Gambar 22. Rata- Rata Kadar Karbohidrat Pasta Hidrolisat Protein Keong Mas Segar dengan Lama Fermentasi yang berbeda

Gambar 22 memperlihatkan bahwa semakin lama fermentasi akan meningkatkan kadar karbohidrat pada hidrolisat protein keong mas segar. Hal ini dimungkinkan karena perhitungan karbohidrat berdasarkan metode *by difference* yang dimana perhitungan tersebut tidak menghitung jumlah karbohidrat secara utuh. Billah (2009) melaporkan bahwa kenaikan kadar karbohidrat menunjukkan bahwa semakin lamanya waktu fermentasi (sampai waktu optimum/hari) maka semakin besar pula kadar karbohidrat pada hidrolisat protein keong mas.

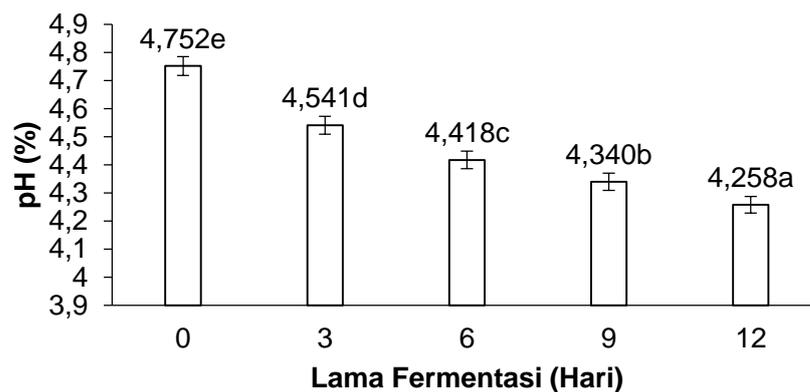
#### 4.2.4 Nilai pH

Data pengamatan dan analisis data pH kontrol atau fermentasi 0 hari dan pH pasta hidrolisat protein keong mas segar dengan penambahan volume molase rebus dan lama fermentasi yang berbeda dapat dilihat pada lampiran 17. Hasil analisis data menunjukkan bahwa antar lama fermentasi dan volume molase memberikan pengaruh yang nyata ( $p < 0,05$ ) terhadap pH pasta hidrolisat protein keong mas. Rata-rata pH kontrol dan pasta hidrolisat protein keong mas segar dengan penambahan volume molase dan lama fermentasi yang berbeda dapat dilihat pada Gambar 23 dan 24.



Gambar 23. Rata- Rata Nilai pH Pasta Hidrolisat Protein Keong Mas Segar dengan Penambahn Volume Molase yang Berbeda

Gambar 23 menunjukkan bahwa adanya peningkatan volume molase dapat menurunkan pH hidrolisat protein keong mas. Yunika (2015) menambahkan bahwa semakin banyak volume molase yang ditambahkan maka semakin rendah pH yang akan dihasilkan. Hal ini dimungkinkan karena semakin banyak volume molase yang ditambahkan maka aktifitas khamir laut untuk memecah komponen karbohidrat dari molase semakin meningkat. Terpecahnya komponen karbohidrat dari molase akan membentuk asam-asam amino yang mudah menguap., diantaranya asam asetat, asam laktat, dan asam piruvat. Novianti (2007), menambahkan selama terbentuknya asam yang dihasilkan sehingga pH lingkungan akan semakin menurun. Ditambahkan oleh Simanjourang *et al.*, (2012), menyatakan bahwa aktifitas khamir laut meningkat seiring dengan lama fermentasi dapat memicu pengeluaran enzim yang lebih banyak. Enzim yang banyak akan meningkatkan proses hidrolisis hidrolisat protein pada substrat yang menghasilkan peptida dan asam-asam amino sehingga pH akan menjadi menurun.

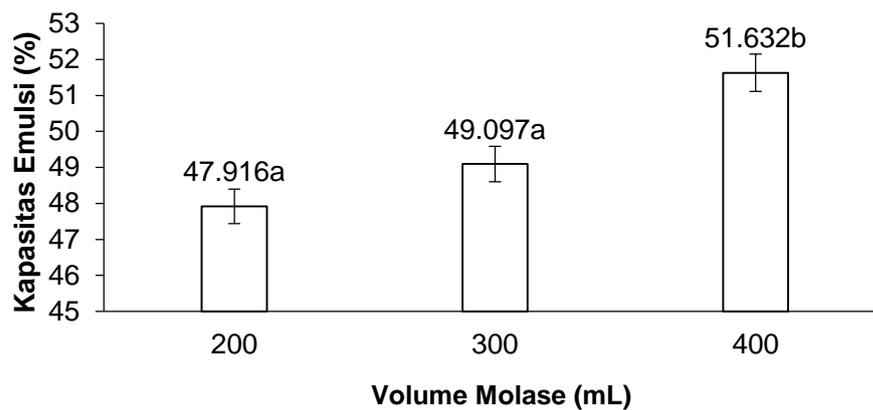


Gambar 24. Rata- Rata Nilai pH Pasta Hidrolisat Protein Keong Mas Segar dengan Lama Fermentasi yang Berbeda

Gambar 24 menunjukkan bahwa semakin lama fermentasi maka dapat menurunkan pH pasta hidrolisat protein keong mas. Hal ini dimungkinkan karena pada produk fermentasi sendiri adalah bersifat asam, yaitu semakin lama proses fermentasi maka akan semakin banyak jumlah asam yang dihasilkan sehingga pH lingkungan akan semakin menurun. Simanjorang *et al.*, (2012), menyatakan bahwa aktivitas khamir laut meningkat seiring dengan lama fermentasi dan dapat memicu pengeluaran enzim yang lebih banyak. Enzim yang banyak akan meningkatkan proses hidrolisis hidrolisat protein pada substrat yang menghasilkan peptida dan asam-asam amino sehingga pH menurun.

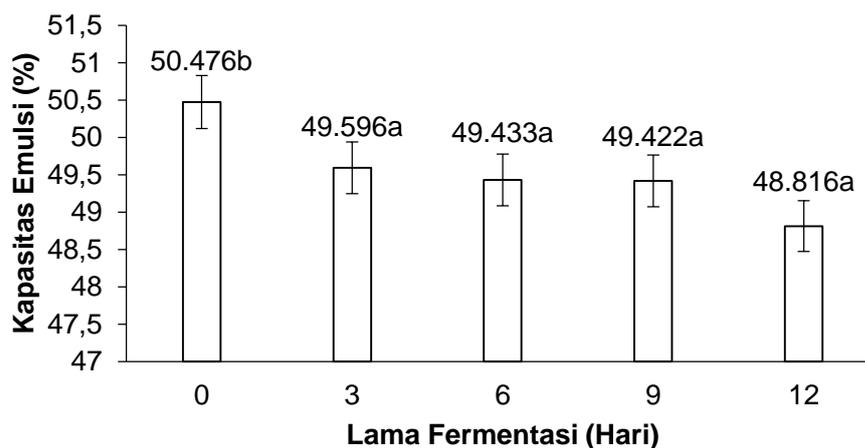
#### 4.2.5 Kapasitas Emulsi

Data pengamatan dan analisis data emulsi kontrol fermentasi 0 hari dan emulsi pasta hidrolisat protein keong mas segar dan lama fermentasi yang berbeda dapat dilihat pada Lampiran 18. Hasil analisis data menunjukkan bahwa antar lama fermentasi dan volume molase rebus memberikan pengaruh yang nyata ( $p < 0,05$ ) terhadap emulsi pasta hidrolisa protein keong mas segar. Rata-rata kapasitas emulsi kontrol dan pasta hidrolisat protein keong mas segar dengan penambahan volume molase rebus dan lama fermentasi yang berbeda dapat dilihat pada Gambar 25 dan 26.



Gambar 25. Rata- Rata Kapasitas Emulsi Pasta Hidrolisat Protein Keong Mas Segar dengan Volume Molase yang Berbeda

Gambar 25 menunjukkan bahwa semakin tinggi volume molase yang diberikan maka kapasitas emulsi pada hidrolisat protein keong mas mengalami peningkatan. Hal ini dimungkinkan karena semakin banyak volume molase yang ditambahkan maka ketersediaan nutrisi untuk pertumbuhan khamir laut untuk hidrolisis menghasilkan asam amino. Emulsi berkaitan dengan banyaknya asam amino yang terdapat pada saat proses fermentasi berlangsung. Asam amino memiliki dua gugus yaitu polar dan non polar, gugus polar asam amino akan berikatan dengan gugus polar air dan gugus nonpolar pada asam amino seperti alanin, valin, leusin dan isoleusin, kemudian akan berikatan dengan gugus non polar pada minyak sehingga terbentuk emulsi. Menurut Gbogouri *et al.*, (2004), hidrolisat adalah bahan yang memiliki permukaan aktif dan dapat mengikat dalam air. Karena hidrolisat protein larut dalam air dan mengandung kelompok fungsional hidrofilik dan hidrofobik.



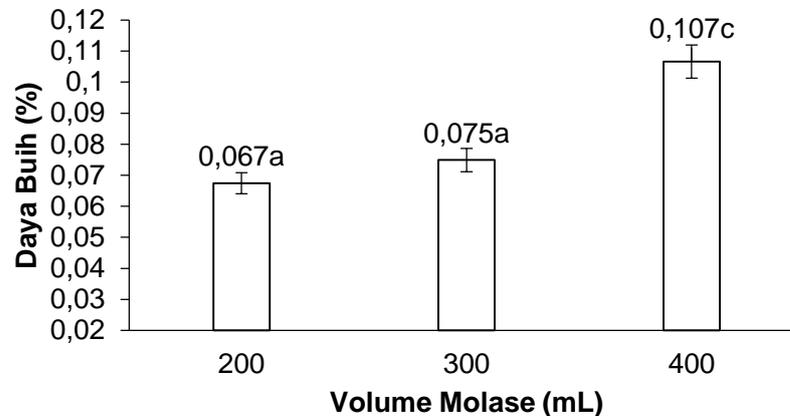
Gambar 26. Rata- Rata Kapasitas Emulsi Pasta Hidrolisat Protein Keong Mas Segar dengan Lama Fermentasi yang Berbeda

Gambar 26 menunjukkan bahwa volume molase dan lama fermentasi dapat menyebabkan penurunan kapasitas emulsi mengalami penurunan. Hal ini dimungkinkan karena ketidakcampuran pada saat homogenisasi sehingga emulsi sulit terbentuk. Fathoni (2014) menyatakan bahwa semakin lama fermentasi maka kapasitas emulsi akan semakin menurun. Kusmiati, (2011) melaporkan bahwa semakin besar ketidak campuran maka semakin besar tegangan permukaan dan emulsi sulit terbentuk. Selain itu, penurunan kapasitas emulsi juga dapat disebabkan oleh rendahnya lemak yang terdapat pada hidrolisat protein keong mas segar, sehingga gugus non polar minyak/ lemak dan akhirnya emulsi yang terbentuk semakin sedikit

#### 4.2.6 Daya Buih

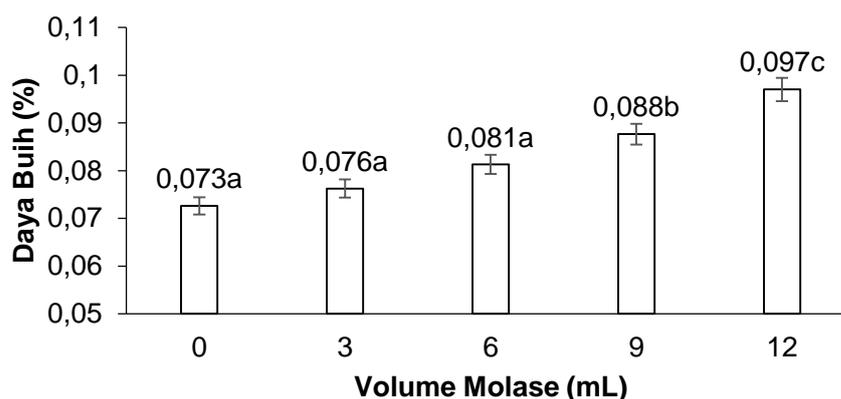
Data pengamatan dan analisa data daya buih kontrol fermentasi 0 hari dan daya buih pasta hidrolisat protein keong mas segar dengan penambahan volume molase rebus dan lama fermentasi yang berbeda dapat dilihat pada Lampiran 19. Hasil analisis data menunjukkan bahwa antar lama fermentasi dan volume memberikan pengaruh yang nyata ( $p < 0, 05$ ) terhadap daya buih pasta hidrolisat protein keong mas. Rata- rata daya buih kontrol dan pasta hidrolisat keong mas

segar dengan penambahan volume molase dan lama fermentasi yang berbeda dapat dilihat pada Gambar 27 dan 28.



Gambar 27. Rata- Rata Daya Buih Pasta Hidrolisat Protein Keong Mas Segar dengan Volume Molase yang Berbeda

Gambar 27 menunjukkan bahwa peningkatan volume molase dapat meningkatkan daya buih hidrolisat protein keong mas segar. Hal ini dimungkinkan karena daya buih sangat dipengaruhi oleh jumlah protein yang terhidrolisis selama fermentasi. Siregar (2012) menyatakan bahwa kenaikan daya buih dikarenakan karena protein mengikat air masih kuat sehingga kestabilan buihnya tinggi. Daya buih terbentuk dari peptida hidropobik yang dapat mengabsorpsi antara fase udara-air, sehingga dapat membentuk buih yang banyak. Jika waktu hidolisis bertambah peptida hidropobiknya berkurang dan diduga terjadi pengurangan berat molekulnya yang dapat meningkatkan kestabilan buih yang dihasilkan (Koesoemawardhani 2011).



Gambar 28. Rata- Rata Daya Buih Pasta Hidrolisat Protein Keong Mas Segar dengan Lama Fermentasi yang Berbeda

Gambar 28 menunjukkan bahwa semakin lama fermentasi dapat meningkatkan daya buih pasta hidrolisat protein keong mas. Hal ini sesuai dengan penelitian Koesoemawardani *et al.*, (2010) yang menyatakan bahwa hidrolisat protein yang tinggi mempunyai nilai protein terlarut tinggi maka daya buihnya juga tinggi. Budy (2014) melaporkan bahwa adanya interaksi volume molase rebus dan lama fermentasi dapat meningkatkan daya buih, hal ini dimungkinkan molase rebus dapat membantu menyediakan energi bagi khamir laut dalam menghidrolisis protein dan semakin lama fermentasi maka semakin banyak protein yang terhidrolisis sehingga semakin banyak asam amino hidrofobik seperti serin, treonin dan tirosin yang terbentuk maka berpengaruh pada semakin banyaknya daya buih yang dihasilkan.

#### 4.3 Hidrolisat Protein Keong Mas Perlakuan Terbaik

Berdasarkan hasil analisa proksimat terbaik dan parameter keong mas diperoleh hasil terbaik yaitu hidrolisat protein keong mas diperoleh hasil terbaik yaitu hidrolisat pada lama fermentasi 12 hari dengan volume 400 mL. Hal ini ditinjau dari kandungan protein tertinggi yang diperoleh dari hidrolisat protein keong mas antar perlakuan. Hidrolisat terbaik dilihat dari hasil kadar protein yang

tertinggi (Purbasari, 2008). Komposisi kimia hidrolisat protein keong mas terbaik, keong mas segar dan keong mas rebus dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Komposisi Kimia Perbandingan Perlakuan Terbaik

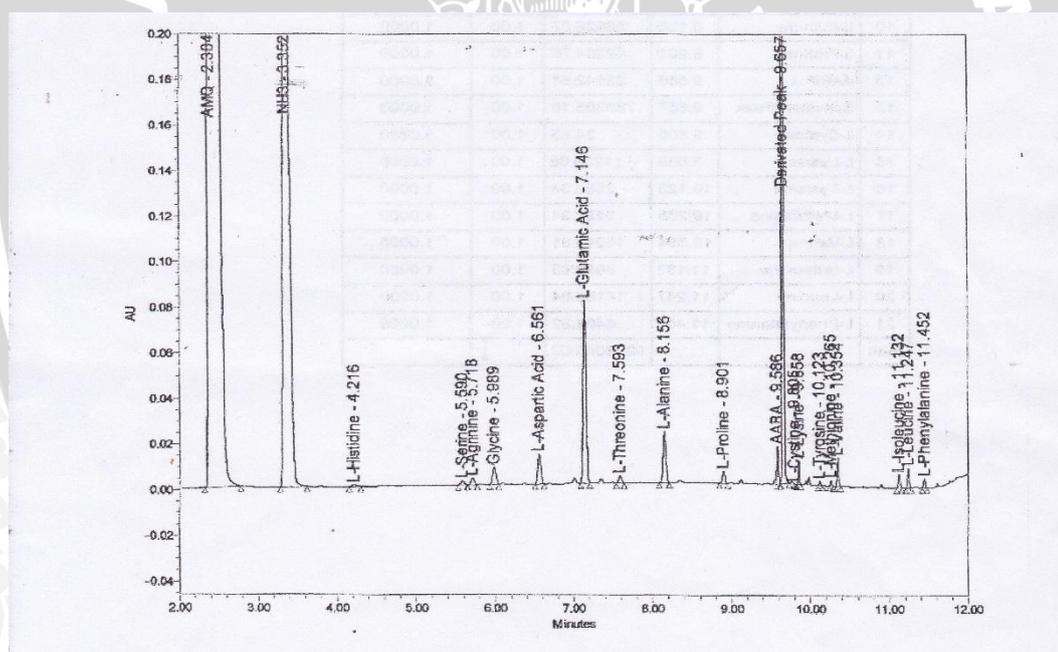
Parameter	Satuan	Keong Mas Segar*	Keong Mas Rebus**	Hidrolisat Keong Mas Segar Terbaik
Kadar Protein	%	10,77%	10,86	26,614%
Kadar Air	%	75,65%	68,36	17,664%
Kadar Lemak	%	0,68%	0,70	1,820%
Kadar Abu	%	2,21%	4,40	11,97%
Kadar Karbohidat	%	3,47%	-	40,111%
pH	%	-	-	4,258%
Emulsi	%	-	-	48,816%
Daya Buih	%	-	-	0,097%

Sumber: Laboratorium Teknologi Hasil Perikanan  
Noviana, (2012)\*  
Dewi, (2012)\*\*

Tabel 6 menunjukkan bahwa kandungan protein pasta hidrolisat protein keong mas segar lebih tinggi bila dibandingkan dengan bahan baku. Hal ini menunjukkan terjadinya hidrolisis protein keong mas rebus oleh enzim protease khamir laut. Budy (2014) melaporkan bahwa konsentrasi enzim proteolitik yang semakin meningkat dalam proses hidrolisis akan menyebabkan peningkatan kandungan nitrogen terlarut yang terdapat didalam produk hidrolisat protein. Kurniawan (2012) menambahkan bahwa hidrolisis protein dipengaruhi oleh konsentrasi bahan penghidrolisis, suhu, pH, dan waktu hidrolisis. Peningkatan konsentrasi enzim akan meningkatkan volume hidrolisat protein ikan yang bersifat tak larut menjadi senyawa nitrogen yang bersifat larut.

#### 4.4 Analisis Total Asam Amino

Kualitas protein dapat ditentukan dengan melihat asam amino penyusunnya. Tidak semua protein mempunyai nilai gizi yang sama karena perbedaan pada jumlah dan jenis asam amino yang terkandung dalam tiap protein. Analisis total asam amino dilakukan berdasarkan hasil analisa proksimat hidrolisat protein yaitu pada uji protein yang terbaik pada lama fermentasi ke-12 volume 400 mL. Analisis asam amino dilakukan untuk mengetahui kandungan asam amino yang terkandung dalam hidrolisat protein keong mas segar. Analisis data total asam amino hidrolisat protein keong mas segar dilakukan dengan metode HPLC (*High Performance Liquid Chromatogram*). Hasil Kromatogram Asam Amino Hidrolisat Protein Keong Mas Segar dapat dilihat pada Gambar 29.



Gambar 29. Hasil Kromatogram Asam Amino Hidrolisat Protein Keong Mas Segar

Gambar 29 menunjukkan bahwa kandungan asam amino non esensial yaitu asam glutamat lebih tinggi dibandingkan dengan asam amino lainnya pada hidrolisat protein keong mas segar. Hal ini dapat dimungkinkan pada asam amino glutamat merupakan jenis asam amino yang bersifat polar sehingga dengan

adanya perebusan maka akan meningkatkan jumlahnya. Nurjannah *et al.*, (2014) melaporkan bahwa tingginya kadar asam glutamat disebabkan oleh proses analisis asam dengan derajat analisis yang lebih tinggi, selain itu asam amino glutamin mengalami deaminasi yang membentuk asam glutamat. Analisis data total asam amino hidrolisat protein keong mas dapat dilihat pada tabel 7 yang dibandingkan dengan total asam amino dari kerang hijau dan kerang mas ngur.

Tabel 7. Kandungan Asam Amino pada Hidrolisat Protein Keong Mas Segar, Kerang Hijau dan Kerang Mas Ngur.

No	Jenis Asam Amino	Komponen Asam Amino		
		Hidrolisat Protein Keong Mas (%)	Hidrolisat Protein Kerang Mas Ngur (%)*	Hidrolisat Protein Kerang Hijau (%)**
<b>Esensial</b>				
1	Valin	0,39	2,296	1,60
2	Phenilalanin	0,20	2,273	0,69
3	Lisin	0,33	3,308	1,23
4	Histidin	0,10	1,78	1,60
5	Arginin	0,29	1,096	1,12
6	Leusin	0,41	4,195	1,87
7	Isoleusin	0,26	4,203	1,23
8	Threonin	0,23	3,291	0,79
9	Methionin	0,10	1,755	-
<b>Non Esensial</b>				
10	Sistin	-	1,026	0,63
11	Alanin	1,19	2,76	0,97
12	Aspartat	1,36	6,78	1,89
13	Serin	0,14	1,641	1,02
14	Glutamat	8,87	13,085	5,54
15	Tirosin	0,09	3,156	0,04
16	Glisin	0,35	1,813	1,08
17	Prolin	0,32	1,296	0,61
<b>Total</b>		<b>14,61%</b>	<b>55,57%</b>	<b>21,91%</b>

Sumber : Amalia, 2007\*\*  
Purbasari, 2008\*

Keterangan : - : tidak teridentifikasi

Tabel 7 menunjukkan bahwa hidrolisat protein keong mas segar memiliki 16 jenis asam amino yang terdiri dari 9 asam amino esensial dan 7 asam amino non esensial. Asam amino esensial yaitu: valin, phenilalanin, lisin, histidin, arginin, leusin, isoleusin, threonin dan methionin. Sedangkan Asam amino non esensial yaitu sistin, alanin, aspartat, serin, glutamat, tirosin, glisin dan prolin. Hal ini

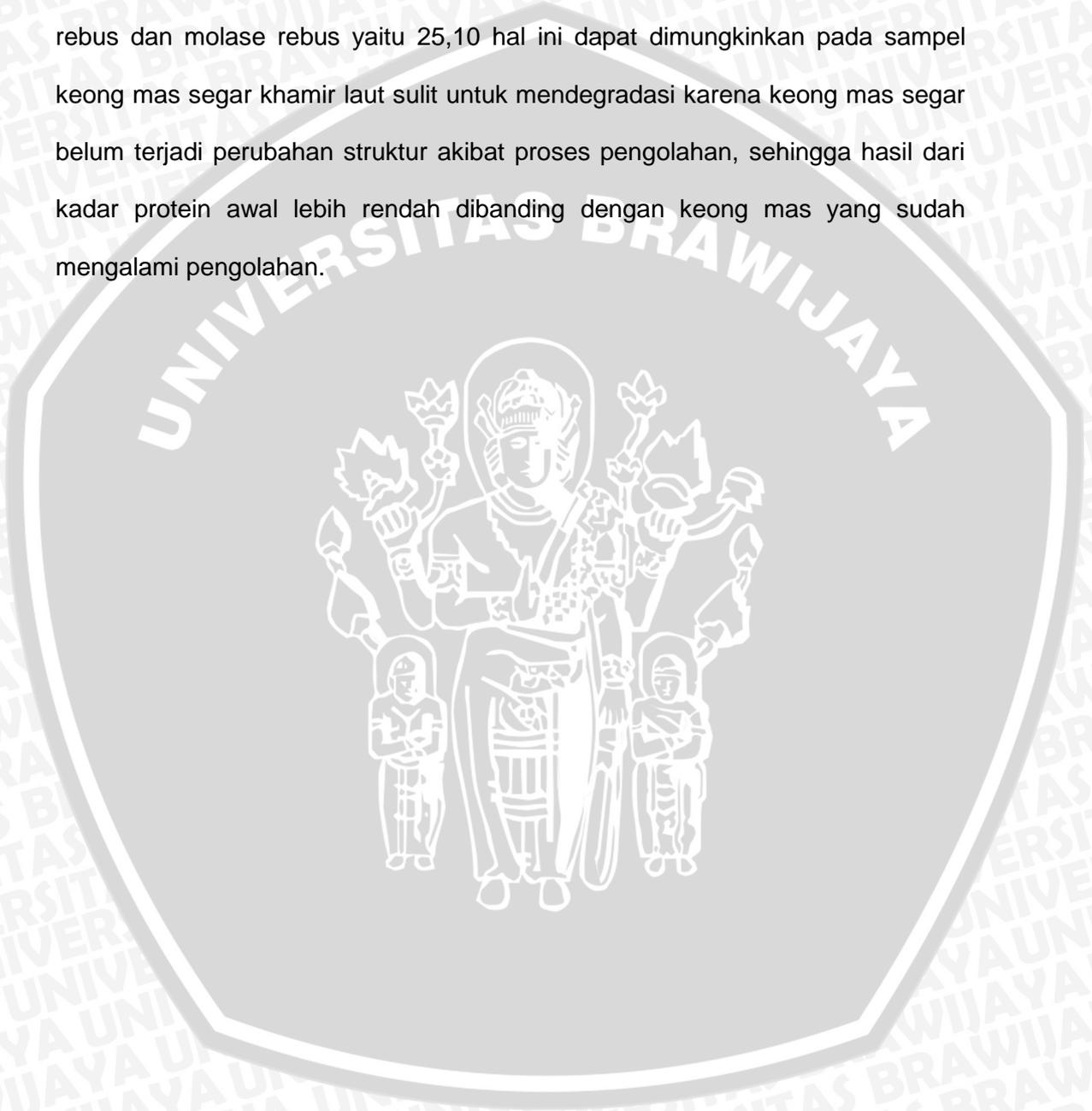
menunjukkan bahwa asam amino pada produk hidrolisat protein keong mas tersebut diperoleh hampir semua jenis asam amino ada kecuali sistin. Asam amino yang tidak dapat teridentifikasi seperti sistin hal ini dimungkinkan karena kandungan asam amino tersebut sangat rendah sehingga tidak terdeteksi atau telah terjadi kerusakan pada saat hidrolisis dan pengeringan. Simanjorang (2012) menyatakan bahwa penguraian asam amino lebih lanjut yang pada akhirnya banyak menunjukkan terbentuknya senyawa-senyawa folatil, diantaranya yaitu amonia ( $\text{NH}_3$ ).

Tabel 7 juga menunjukkan bahwa hidrolisat protein keong mas segar memiliki kandungan asam amino yang jauh lebih rendah dibanding dengan hidrolisat protein kerang hijau dan kerang mas ngur. Hal ini dimungkinkan karena perbedaan kandungan protein pada bahan baku yang digunakan berbeda dan protein yang terlarut dalam pada hidrolisat protein keong mas sebagian besar masih dalam bentuk peptida-peptida. Amalia (2007) menambahkan bahwa kemampuan enzim dalam menguraikan protein menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana mempengaruhi kandungan asam amino pada produk hidrolisat protein keong mas. Protein akan diuraikan menjadi peptida-peptida oleh enzim kemudian peptida diuraikan menjadi asam amino. Faktor-faktor seperti pH, suhu, konsentrasi enzim dapat mempengaruhi hidrolisis.

Tabel 7 menunjukkan bahwa kandungan asam amino non esensial alanin dan aspartat lebih tinggi dari kandungan asam amino lainnya. Hidayat (2005) menyatakan bahwa tingginya asam amino non esensial dimungkinkan pada proses hidrolisis yang dilakukan mendekati sempurna. Bila hidrolisis dapat berjalan dengan sempurna maka akan dihasilkan asam amino yang bernilai tinggi. Amalia (2007) menambahkan bahwa sebagai bahan pangan, asam amino serin, glisin, alanin, serin, threonin, sistein dan prolin memiliki rasa yang manis. Arginin, valin, leusin, isoleusin, phenilalanin, triptofan dan tirosin memiliki rasa pahit.

Sementara lisin dan metionin memiliki rasa manis dan pahit dan rasa gurih disebabkan oleh asam glutamat.

Analisis kadar asam amino pada hidrolisat protein keong mas segar dan volume molase rebus lebih tinggi yaitu 26,614 dibandingkan pada keong mas rebus dan molase rebus yaitu 25,10 hal ini dapat dimungkinkan pada sampel keong mas segar khamir laut sulit untuk mendegradasi karena keong mas segar belum terjadi perubahan struktur akibat proses pengolahan, sehingga hasil dari kadar protein awal lebih rendah dibanding dengan keong mas yang sudah mengalami pengolahan.



## 5. PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian tentang pengaruh volume molase rebus dan lama fermentasi yang berbeda terhadap kualitas hidrolisat protein keong mas segar adalah:

- Volume molase rebus yang tepat terhadap karakteristik pada hidrolisat protein keong mas adalah sebanyak 400 mL dengan kandungan nutrisi sebesar 20,84% air, 3,554% lemak, 21,284% protein, 16,224% abu, 43,556% karbohidrat, 4,43% pH, 51,632% emulsi dan 0,107% buih.
- Lama fermentasi yang berbeda terhadap karakteristik pasta hidrolisat protein keong mas segar adalah pada hari ke-12 dengan nutrisi sebesar 17,664% kadar air, 1,820 % lemak, 26,614% protein, 11,97% abu, 40,111% karbohidrat, 44,258% pH, 48,816% emulsi dan 0,097% buih.
- Total kandungan asam amino hidrolisat protein keong mas segar terbaik pada perlakuan fermentasi 12 hari dan penambahan volume molase 400 mL yaitu 14,61%.

### 5.2 SARAN

Saran yang dapat diambil dari penelitian ini adalah penambahan volume molase rebus 400 mL dan lama fermentasi 12 hari dapat menghasilkan kualitas hidrolisat protein keong mas (*Pomacea canaliculata*) segar yang lebih baik dibandingkan lainnya. Selain itu, perlunya dilakukan penelitian lanjutan mengenai hidrolisat protein keong mas segar dengan menggunakan enzim khamir laut yang lebih murni.

## DAFTAR PUSTAKA

- Adawyah, R. 2007. Pengolahan dan Pengawetan Ikan. PT. Bumi Aksara. Jakarta.
- Ahmad, Riza Zainuddin. 2005. Pemanfaatan Khamir *Saccaromyces cerevisiae* Untuk Ternak. Balai Penelitian Veteriner. PO Box 151: Bogor.
- Akili, Y. R. R. 2012. Karakteristik Ekstrakseluler Khamir Laut yang dipanen pada Fase Log dan Aktivitas Hidrolisisnya terhadap Kualitas Protein Ikan Peperek (*Leiognathus* sp.). Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Brawijaya. Malang.
- Amalia, Elin. 2007. Pemanfaatan Kerang Hijau (*Mytilus viridis*) Dalam Pembuatan Hidrolisat Protein Menggunakan Enzim Papain. Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor: Bogor.
- Aisyah, Yuliani., Rasdiansyah., Muhaimin. 2014. Pengaruh Pemanasan Terhadap Aktivitas Pada Beberapa Jenis Sayuran. Program Studi Teknologi Hasil Pertanian. Fakultas Pertanian. Universitas Syiah Kuala. Darussalam Banda Aceh.
- Apriwinda. 2013. Studi Fermentasi Nira Batang Sorgum Manis (*Sorghum bicolor* (L) Moench) Untuk Produksi Etanol. Fakultas Pertanian. Universitas Hasanudin: Semarang.
- Ardiansari, Yasinta Marta. 2012. Pengaruh Jenis Gadung dan Lama Perebusan Terhadap Kadar Sianida Gadung. Skripsi. Fakultas Kesehatan Masyarakat. Universitas Jember.
- Azizah, N. 2013. Pengaruh Metode Pembelajaran Terhadap Hasil Belajar Mata Pelajaran Dasar Kompetensi Kejuruan Di SMK Wongsorejo Gombang. Skripsi. Fakultas Teknik. Universitas Negeri Yogyakarta.
- Baila, R, L. 2004. Potensi dan Prospek Yeast (khamir) Dalam Meningkatkan Diversifikasi Pangan di Indonesia. Depdiknas. Universitas Padjajaran Bandung: Bandung.
- Barathi, S., D. Saravanan, M. Radhakrisnan, and R. Balagurunathan. 2011. Bioprospecting of Marine Yeast with Special Refrence to Inulinase Production. J. Chem. Tech. Research.
- Bernadeta, Puji, A., dan Imelda, H. S. 2012. Penentuan Kondisi Optimum Hidrolisat Protein Dari Limbah Ikan Ekor Kuning (*Caesio cuning*) Berdasarkan Karakteristik Organoleptik. *Jurnal Kimia Khatulistiwa*.
- Billah, Mu'tasim. 2009. Pemanfaatan Limbah Ikan /tuna Melalui Proses Fermentasi Anaerob Menggunakan Bakteri Ruminansia. Prodi Teknik Kimia FTI-UPNV Jatim. *Jurnal Ilmiah Teknik Lingkungan*.
- Brink, P. J dan M. J. Wood. 2000. Langkah Dasar dalam Perencanaan Riset Keperawatan. Penerbit Buku Kedokteran: Jakarta.

- Budy, D. 2014. Pengaruh Volume Molase Rebus dan Lama Fermentasi yang Berbeda dengan Starter Khamir Laut Terhadap Kualitas Hidrolisat Protein Kepala Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*) Rebus. Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Brawijaya. Malang.
- Bueno-Solano, C., J. Lopez-Cervantes, O. N. Campas-Baypoli, R. Lauterio-Garcia, N. P. Adan-Bante, and D. I. Sanchez-Machado. 2008. Chemical and Biological Characteristics of Protein Hydrolysates from Fermented Shrimp by-Products. *Food Chem.*
- Dewi, Y.P. 2012. Perubahan Kandungan Asam Lemak Dan Kolestrol Keong Mas (*Pomacea canaliculata*) Akibat Proses Pengolahan. Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor: Bogor.
- Edahwati, Luluk., Suprihatin. 2009. Kombinasi Proses Aerasi, Adsorpsi dan Filtrasi Pada Pengolahan Air Limbah Industri Perikanan. Program Studi Teknik Kimia. Fakultas Teknologi Industri. UPN Veteran: Surabaya.
- Eka p, Agustinus., Umran Halim. 2002. Pembuatan Bioethanol dari Nira Siwalan Secara Fermentasi Fese Cair Menggunakan Fermipan. Jurusan Teknik Kimia. Fakultas Teknik. Universitas Diponegoro: Semarang.
- Fajarwati, S. 2002. Protein Sel Tunggal *Candida utilis* pada Media Molase dengan Penambahan Glukosa dan Urea. Skripsi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Diponegoro: Semarang.
- Falahudin, Dede. 2008. Penghambatan Peroksidasi Lipid Sel Khamir *Candida sp.* Y390. Oleh Ekstrak Daging Buah Salak Bongkok (*Salacca edulis Reinew*). Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Institut Pertanian Bogor: Bogor.
- Fardiaz, S. 1989. Mikrobiologi Pangan. Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi. Institut Pertanian Bogor: Bogor.
- Fardiaz, S. 1992. Mikrobiologi Pangan I. Gramedia: Jakarta.
- Fathoni, Ahmad. 2015. Pengaruh Volume Molase Rebus dan Lama Fermentasi yang Berbeda dengan Starter Khamir Laut Terhadap Kualitas Hidrolisat Protein Kepala Udang vannamei (*litopenaeus vannamei*). Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Brawijaya: Malang.
- Fauzi, Muhammad. 2009. Kurva Pertumbuhan Isolat Bakteri Asam Laktat (BAL) Biji Luwak Pada Beberapa Media. Laporan Penelitian. Jurusan Teknologi Hasil Pertanian. Fakultas Teknologi Pertanian. Universitas Jember: Jember.
- Febriani, Mifida. 2006. Substitusi Protein Hewani dengan Tepung Kedelai dan Khamir Laut Untuk Pakan Ikan Patin (*Pangasius sp*) dan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*). *Jurnal Perikanan Indonesia*.
- Febriani, Mifida. 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: Malang.

- Febriani, Mifida. 2010. Penggunaan Khamir Laut Sebagai Biokatalisator Dalam Pembuatan Silase Daun Mengkudu (*Morinda citrifolia*) Sebagai Salah Satu Bahan Alternatif Pakan Ikan. Jurusan Perikanan Fakultas Teknik dan Ilmu Kelautan. Universitas Hang Tuah: Surabaya.
- Gbogouri, G. A., M. Linder, J. Fanni, dan M. Parmentier. 2004. Influence of Hydrolysis Degree on the Functional Properties of Salmon Byproducts Hydrolysates. *J. Food Sci.*
- Hendawati, Rina. 2011. Pemanfaatan Limbah Produksi Pangan dan Keong Emas (*Pomacea canaliculata*) Sebagai Pakan Untuk Meningkatkan Pertumbuhan Ikan Lele Dumbo (*Clarias gariepinus*). Jurusan Biologi. Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Sebelas Maret: Surakarta.
- Hidayat, Taufik. 2005. Pembuatan Hidrolisat Protein dari Ikan Selar Kuning (*Caranx leptolepis*) Dengan Menggunakan Enzim Papain. Program Studi Teknologi Hasil Perikanan. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor: Bogor.
- Hidayati, D., Baido, D., Hastuti, S. 2013. Pola Pertumbuhan Ragi Tape pada Fermentasi Kulit Singkong. *Jurnal Agointek.*
- Haslina. 2004. Nilai Gizi Daya Cerna Protein dan Daya Terima Patilo Sebagai Makanan Jajanan yang Diperkaya dengan Hidrolisat Protein Ikan Mujair (*Oreochromis mosambicus*). Tesis. Program Pasca Sarjana. Universitas Diponegoro Semarang: Semarang.
- Jannah, A.K. 2012. Pengaruh Khamir Laut Jenis Campuran yang Dipanen Pada Fase Log dalam Menghidrolisis Protein Kerang Darah (*Anadara granosa*). Skripsi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Brawijaya: Malang.
- Juwita, Ratna. 2012. Studi Produksi Alkohol dari Tetes Tebu (*Saccharum officinarum* L) Selama Proses Fermentasi. Skripsi. Jurusan Teknologi Pertanian. Fakultas Pertanian. Universitas Hasanuddin Makassar: Makassar.
- Koesoemawardhani, Dyah., Fibra Nurainy., Sri Hdayati. 2011. Proses Pembuatan Hidrolisat Protein Ikan Ruchah. Jurusan Teknologi Hasil Pertanian. Universitas Lampung: Lampung.
- Kristianawati, Ferika., Ratna Ibrahim., Laras Rianingsih. 2014. Penambahan Enzim yang Berbeda Pada Pengolahan Kecap Ikan Dari Isi Rongga Perut Ikan Manyung (*Arius thalasinus*) Terhadap Mutu Produk. Program Studi Teknologi Hasil Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Diponegoro: Semarang.
- Kurniawan, Susi Lestari, Siti Hanggita RJ. 2012. Hidrolisat Protein Tinta Cumi (*Loligo* sp) Dengan Enzim Papain. Program Studi Teknologi Hasil Perikanan Universitas Sriwijaya.
- Kusmiati, A. Thontowi, dan S. Nuswantara. 2011. Efek Sumber Karbon Berbeda terhadap Produksi  $\alpha$ -Glukan oleh *Saccharomyces cerevisiae* pada Fermentor Air Lift. *J. Natur Indonesia.*

- Kusnandar, Feri. 2010. Kimia Pangan Komponen Makro. PT Dian Rakyat: Jakarta.
- Legowo, A. M., Nurwantoro, dan Sutaryo. 2007. Analisis Pangan. Buku Ajar Fakultas Peternakan Universitas Diponegoro. Semarang.
- Noviana, Y., Susi, L., dan Siti, H. R. J. 2012. Karakteristik Kimia dan Mikrobiologi Silase Keong Mas (*Pomacea canaliculata*) dengan Penambahan Asam Format dan Bakteri Asam Laktat 3B104. *Jurnal Fish technology*.
- Noviati. 2007. Optimasi Kadar Molase Dalam Medium Ekstrak Ubi Jalar Untuk Pertumbuhan Isolat Khamir R1 dan R2 Pada Fermentor *Air Lift* 18 Liter. Universitas Sains dan Bioteknologi. Universitas Islam Syarif Hidayatullah: Jakarta.
- Nurjannah., Ruddy Suwandi., Ginanjar Pratama. 2014. Perubahan Karakteristik Asam Amino Ikan Buntal Pisang (*Tetraodon lunaris*) Perairan Cirebon Akibat Penggorengan. Departemen Hasil Perairan. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor: Bogor.
- Nurhayati, T., Ella, S., Cholifah, dan Roni, N. 2014. Optimasi Proses Pembuatan Hidrolisat Jeroan Ikan Kakap Putih. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia (JPHPI)*.
- Pangesti, N. W. I., Pangastuti A., Retnaningtyas. 2012. Penambahan Molase Pada Produksi Enzim Xilanase niger dengan Substrat Jerami Padi. *Jurnal Bioteknologi ISSN 0216-68887*.
- Purbasari, Dian. 2008. Produk dan Karakterisasi Hidrolisat Protein Dari Kerang Mas Ngur (*Atactodea striata*). Program Studi Teknologi Hasil Perikanan . institut Pertanian Bogor: bogor.
- Rahmadi, D. 2003. Pengaruh Lama Fermentasi Dengan Kultur Mikroorganismes Campuran Terhadap Komposisi Kimiawi Limbah Kubis. Fakultas Peternakan. Universitas Diponegoro: Semarang.
- Rieuwpassa, F. J., J. Santoso, dan W. Trilaksana. 2013. Karakterisasi Sifat Fungsional Konsentrat Protein Telur Ikan Cakalang (*Katsuwonus pelamis*). *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan*.
- Rita, Irma. 2011. Proses Emulsifikasi dan Analisis Biaya Produksi Minuman Emulsi Minyak Sawit Merah. Sekolah Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor: Bogor.
- Riyani, Safrida. 2014. Mortalitas Keong Mas (*Pomacea canaliculata*) Setelah Pemberian Testa Jambu Mete (*Anacardium occidentale*). Skripsi. Fakultas Sains dan Teknologi. UIN Sunan Kalijaga: Yogyakarta.
- Riyanto. 2003. Aspek-Aspek Biologi Keong Mas (*Pomacea canaliculata* L). Dosen Pendidikan Biologi FKIP Universitas Sriwijaya.
- Riyanto. 2004. Pola Distribusi Populasi Keong Mas (*Pomacea canaliculata* L) Di Kecamatan Belitang Oku. *Majalah Sriwijaya*, Volume 37, Nomor 1.

- Rustan, Ida Reskia. 2013. Studi Isolasi dan Identifikasi Asam laktat Dari Fermentasi Cabai Rawit (*Capsium frutescens L.*). Skripsi. Jurusan Teknologi Pertanian. Fakultas Pertanian. Universitas Hasanuddin Makassar: Makassar.
- Rohim, A. 2014. Pengaruh Perbedaan Penambahan Kadar Molase Rebus pada Medium Gula Terhadap Biomassa Sel Khamir Laut. Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Brawijaya. Malang.
- Sari, S. P. 2014. Substitusi Molase Rebus dengan Kadar yang Berbeda pada Medium Fermentasi Khamir Laut. Laporan Skripsi. Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya. Malang
- Sari, Reni Permata. 2015. Hidrolisat Protein Eceng Gondok (*Eichornia crassipes*) Segar Menggunakan Starter Khamir Laut dan Molase Segar dengan Proses Fermentasi. Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Brawijaya Malang: Malang.
- Sastra, Windo. 2008. Fermentasi Rusip. Program Studi Teknologi Hasil Perikanan. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor: Bogor.
- Savitri, R. D. 2011. Aplikasi Proses Hidrolisis Enzimatis dan Fermentasi dalam Pengolahan *Condiment* Kupang Putih (*Corbula faba H.*). Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor: Bogor.
- Sebayang, Firman. 2006. Pembuatan Etanol dari Molase Secara Fermentasi Menggunakan Sel *saccaromyces serevisiae* yang Terimobilisasi pada Kalsium Alginat. Departemen Kimia. Fakultas MIPA. Universitas Sumatera Utara: Medan.
- Setiawan, Budi., Dwi Purnomo. 2011. Validasi HPLC Untuk Analisis Anion Fosfat dan Sulfat Dalam Proses Pemurnian Torium Dari Pasir Monasit. Pusat Teknologi Akselerator dan Proses Bahan –BATAN: Babarsari Yogyakarta.
- Simanjorang, Eviyanti., Nia Kurniawati., Zahidah Hasan. 2012. Pengaruh Penggunaan Enzim Papain Dengan Konsentrasi yang Berbeda Terhadap Karakteristik Kimia Kecap Tutut. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Padjadjaran. Jurnal Perikanan dan Kelautan.
- Simanjuntak, Riswan. 2009. Studi Pembuatan Etanol dari Limbah Gula (Molase). Skripsi. Departemen Teknologi Pertanian. Fakultas Pertanian. Universitas Sumatera Utara.
- Siregar, R F., A Histono., Smulyani. 2012. Perubahan Sifat Fungsional Telur Ayam Ras Pasca Pasteurisasi. Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro Semarang: Semarang. *Animal Agricultur Jurnal*.
- Sudarmadji, S., B. Haryono dan Suhardi, 1989. Analisa Bahan Makanan dan dan Pertanian. Liberty Yogyakarta. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Sudarmadji, S., B. Haryono dan Suhardi. 2003. Prosedur Analisa untuk Bahan Makanan dan Pertanian. Liberty Yogyakarta. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

- Sudarminto, S. Y., Pusparani, T. 2014. Pengaruh Fermentasi Alami Pada Chips Ubi Jalar (*Ipomoea batatas*) Terhadap Sifat Fisik Tepung Ubi jalar. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*.
- Sugoro, I. 2006. Optimasi Sumber Nitrogen Probiotik Khamir R1 dan R110 dalam Medium Ekstrak Singkong. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner.
- Sukoso. 2012. Eksplorasi Potensi Khamir Laut. PPSUB. Malang. 72 hlm.
- Susanto, Agus. 2009. Uji Kolerasi Kadar Air Kadar Abu Wateractivity dan Bahan Organic. Pada Jagung Di Tingkat Petani. Pedagang. Pengumpul dan Pedagang Besar. Seminar Nasional. Teknologi Peternakan dan Veteriner.
- Sutardi, T. 1981. Sapi Perah dan Pemberian Makananny. Departemen Ilmu Makanan Ternak. Fakultas Peternakan. Institut Pertanian Bogor: Bogor.
- Utami, I. dan Kindari. 2008. Pembuatan Ethanol dan Biji Kapas dengan Proses Hidrolisa dan Fermentasi. *Jurnal Penelitian Ilmu Teknik*.
- Waluyo, L. 2007. Mikrobiologi Umum. UMM Press. Malang.
- Wicaksana, Bima Risa Adil., Y,S Darmanto., Laras Rianingsih. 2013. Pengaruh Penambahan Starter *Pediococcus spp.* Pada Pembuatan Kecap Ikan Terhadap Jumlah Senyawa Kimia dan Koloni Bakteri. Jurusan Perikanan, Fakultas Perikan dan Ilmu Kelautan. Universitas Diponegoro: Semarang.
- Widyanti, Emmanuella Maria. 2010. Produksi Asam Sitrat Dari Substrat Molase Pada Pengaruh Penambahan VCO (*Virgin coconut oil*) Terhadap Produktifitas *Aspergillus niger itbccl<sub>74</sub>* Terimobilisasi. Tesis. Universitas Diponegoro: Semarang.
- Winarno, F.G. 2004. Kimia pangan dan Gizi. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Winarno, F.G. 2007. Kimia pangan dan Gizi. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Winarso, D. 2003. Perubahan Karakteristik Fisik akibat Perbedaan Umur, Macam Otot, Waktu, dan Temperatur Perebusan pada Daging Ayam Kampung. *Jurnal Indonesia Tropical Animal Agriculture*.
- Wiratno, E N., T Ardyanti., A K Wardani. 2008. Pengaruh Gula Reduksi dan Total Nitrogen Terhadap Densitas dan Viabilitas Sel *Saccaromyces serevixiae* dalam Fermentasi Etanol dan Molase. Laboratorium Mikrobiologi FMIPA. Universitas Brawijaya: Malang.
- Yuliana, Neti. 2008. Kinetika Pertumbuhan Bakteri Asam Laktat Isolat T5 yang Berasal dari Tempoyak. Jurusan Teknologi Hasil Pertanian. Fakultas Pertanian. Universitas Lampung: Lampung.

- Yuniasari, D. 2009. Pengaruh Pemberian Bakteri Nitrifikasi dan Denitrifikasi serta Molase dengan C/N Rasio Berbeda terhadap Profil Kualitas Air, Kelangsungan Hidup, dan Pertumbuhan Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*). Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Yunika, K. R. 2015. Pengaruh Lama Fermentasi dan Perbedaan Konsentrasi Molase Terhadap Kualitas Hidrolisat Protein Kepala Ikan Lele (*Clarias sp.*) Rebus. Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Brawijaya. Malang.
- Yunita, Afni. 2009. Analisis Konsistensi Mutu dan Rendemen CPO *Crude palm oil* di Pabrik Kelapa Sawit Adolina. PT Perkebunan Nusantara IV (Persero). Fakultas Pertanian. Universitas Sumatra Utara.
- Yusma. 1999. Pemanfaatan Limbah Molase Dalam Pembuatan Etanol Secara Fermentasi. Puslitbang Farmasi, Badan Litbangkes, Depkes RI: Jakarta.

