

# KARAKTERISTIK PROTEASE DARI EKSTRAK KASAR KHAMIR LAUT DAN AKTIVITASNYA DALAM MENGHIDROLISIS PROTEIN IKAN RUCAH

Abdul Aziz Jaziri<sup>a, b,\*</sup>, Sukoso<sup>a</sup>, dan M. Firdaus<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup>Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia

<sup>b</sup>Bioseafood Research Group, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia

\*Corresponding author: azizjaziri@ub.ac.id

## Abstrak

Khamir laut merupakan mikroorganisme uniseluler dari golongan jamur. Khamir laut yang diisolasi dari pantai Jawa Timur memiliki potensi bioteknologi di bidang pangan. Khamir laut sebagai penghidrolisis dalam pembuatan hidrolisat ikan rucah dapat meningkatkan nilai nutrisi asam amino. Penelitian tentang karakteristik hidrolisis protease khamir laut dan aktivitasnya dalam menghidrolisis protein masih sedikit dilakukan. Oleh karena itu, dibutuhkan penelitian tentang karakteristik protease khamir laut dan karakteristik hidrolisisnya yang sangat penting menyelesaikan masalah ikan rucah yang melimpah. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui karakteristik protease dari ekstrak kasar khamir laut dan karakteristik hidrolisat protein daging ikan rucah yang dihidrolisis dengan ekstrak kasar dari khamir laut. Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksploratif. Berdasarkan hasil penelitian, karakteristik enzim dari ekstrak khamir laut menunjukkan bahwa nilai konsentrasi protein sebesar 22.17 mg/L, aktivitas protease sebesar 21.50 mU/menit/mL, nilai  $V_{maks}$  sebesar 37.25 mmol/L/menit dan nilai  $K_M$  sebesar  $2.3 \times 10^3$  mM. Sementara itu, karakteristik ekstrak kasar khamir laut dalam hidrolisis protein daging ikan peperek yaitu derajat hidrolisis tertinggi sebesar 22.35%, kandungan asam amino total sebesar 1.32% dan berat molekul 14.39 kDa, dimana hasil karakteristik hidrolisis daging ikan peperek menunjukkan bahwa aktivitas protease dari ekstrak khamir laut mempunyai aktivitas yang rendah, hal ini dimungkinkan karena protease yang digunakan untuk menghidrolisis merupakan ekstrak kasar.

**Kata Kunci:** hidrolisis, ikan rucah, khamir laut, protease

## Abstract

Marine yeast is unicellular microorganism from group of fungi. Marine yeast was isolated from East Java Beach have potentiation of biotechnology in food. Marine yeast as an agent in hydrolyzing trash fish protein to be able to increase nutrition value of amino acid. The researches of protease characteristic from marine yeast and its activity in hydrolyzing protein are poorly demonstrated. Therefore, study on characteristic of protease from marine yeast and its activity is important to overcome abundance of trash fish. The aim of this research was to know protease characteristic of marine yeast and characteristic of trash fish protein hydrolysate. This study used exploration method. The result of this study were the protease characteristic from crude extraction of marine yeast showed that protein concentration value is 22.17 mg/L, protease activity is 21.50 mU/min/mL,  $V_{maks}$  is 37.25 mmol/L/min and  $K_M$  value is  $2.3 \times 10^3$  mM. While the characteristic of trash fish protein hydrolysate is 22.35%, the total of amino acids is 1.32% and the molecular mass is 14.39 kDa. In addition, this study showed that protease activity from marine yeast extraction had low activity because protease extracted from marine yeast is crude extract.

**Keywords:** hydrolysis, marine yeast, protease, trash fish protein

## PENDAHULUAN

Khamir laut merupakan mikroorganisme uniseluler dari golongan jamur, bersifat kemoorganotrop, bereproduksi seksual dengan spora dan aseksual dengan pertunasan dan pembelahan atau kombinasi keduanya.

Khamir laut terdapat di lingkungan perairan, dimana dapat ditemukan di saluran pencernaan organisme laut, air laut dan pasir laut. [1] melaporkan bahwa khamir "Yeast M", laut yang diisolasi pada 1992 dari air laut Miura Peninsula, Jepang, dapat digunakan

Article history:

Diterima / Received 10-10-2017

Disetujui / Accepted 30-10-2017

Diterbitkan / Published 31-10-2017

©2017 at <http://jfmr.ub.ac.id>

untuk memproduksi roti dan minuman beralkohol.

Khamir laut memiliki potensi bioteknologi di bidang pangan. [2] melaporkan bahwa khamir laut sebagai penghidrolisis dalam pembuatan hidrolisat ikan rucah dapat meningkatkan nilai nutrisi asam amino. Selain itu, [3] melaporkan bahwa nutrisi asam lemak pada pembuatan HPI rucah dengan khamir laut juga meningkat. Sementara itu, [4] melaporkan bahwa khamir laut yang diisolasi dari laut Cina Selatan mengandung enzim alkalase dengan aktivitas yang tinggi 623.1 U/mg.

Protease adalah enzim yang menghidrolisis protein dengan memotong ikatan peptida dan mempercepat sintesis peptida [5]. Protease yang banyak digunakan pada pembuatan hidrolisat protein ikan adalah *Papain*, *Alcalase*, *Neutrase*, *Flavourzyme* dan *Protamex* [6]. Hidrolisis protein adalah proses penguraian protein menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana (asam-asam amino) baik oleh enzim, basa maupun asam. Proses hidrolisis dengan asam/ basa dapat merusak sebagian asam amino dan juga menghasilkan senyawa beracun seperti lysinoalanin [7]. Sementara hidrolisis secara enzimatis dapat memperkecil ukuran peptida, yang dapat merubah karakteristik dan meningkatkan kualitas protein. [8] menambahkan bahwa hidrolisat protein menggunakan enzim proteolitik dapat memecah ikatan peptida. Hidrolisis protein secara enzimatis merupakan cara hidrolisis protein yang efisien untuk melarutkan protein ikan. Protein yang dihidrolisis dengan menggunakan enzim sangat tergantung pada tipe enzim, substrat, dan kondisi hidrolisis yang meliputi pH, suhu, lama inkubasi dan konsentrasi enzim hidrolisis.

Ikan rucah merupakan hasil samping pengolahan hasil perikanan atau ikan yang memiliki nilai ekonomis rendah. Umumnya, ikan rucah digunakan sebagai tepung ikan [9]. Salah satu alternatif pengolahan ikan rucah adalah dengan memanfaatkan sebagai produk hidrolisat protein ikan (HPI). HPI dengan menggunakan enzim dapat meningkatkan karakteristik protein ikan dan memiliki nutrisi yang bagus, seperti komposisi asam-asam

amino yang seimbang dan tingkat kelarutan yang tinggi [10]. HPI dapat diaplikasikan sebagai sumber asam-asam amino pada bahan pangan. Hidrolisat protein yang sempurna akan menghasilkan 18-20 jenis asam amino [11]. HPI juga mengandung asam-asam amino esensial, yaitu valin, metionin, lisin, isoleusin, histidin, leusin dan treonin. [12] menyatakan bahwa kandungan asam amino esensial hidrolisat protein ikan 2-5 kali lebih besar dari kandungan asam amino esensial yang disarankan bagi tubuh manusia menurut FAO/WHO tahun 1990.

Penelitian tentang karakteristik hidrolisis protease khamir laut masih sedikit dilakukan. Oleh karena itu, dibutuhkan penelitian tentang karakteristik protease khamir laut dan karakteristik hidrolisisnya. Tujuan dari penelitian ini adalah mendapatkan: 1) karakteristik protease dari ekstrak kasar khamir laut; dan 2) karakteristik HPI dengan menggunakan protease dari ekstrak kasar khamir laut.

## BAHAN DAN METODE

Bahan utama dalam penelitian ini adalah khamir laut yang diperoleh dari hasil kultur [2], protease kasar khamir laut diperoleh dari sentrifugasi khamir laut dalam air laut, ikan rucah didapatkan dari Pelabuhan Tanjung Tembaga, Probolinggo. Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah larutan biuret, BSA (*bovine serum albumin*), *Folin-phenol Ciocalteu reagent*, tirosin, 10% TCA (*trichloroacetic acid*), 0,5% larutan kasein, *glycine-NaOH buffer* (0.05M, pH 9.5), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NaOH, KNa tartrat dan larutan nesler. *separating gel* (12,5%), *stacking gel* (12,5%), *reducing sample buffer* (RSB), *amonium persulfat* (APS), *tetrametiletildiamin* (TEMED) dan *cooamassie blue*, *O-ftatalaldehid* (OPA).

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah galon, botol bensin, kompor, aerator, selang, refraktometer, corong, *sentrifuse* (Hettich mikro 22 R), *waterbath*, pH meter, gelas ukur, stirrer, beaker glass, pH meter, inkubator, falcon, kuvet, *eppendorf*, *micropipet*, *blue pippets*, timbangan analitik, spektrofotometer

(Shimadzu UV-VIS 1700), baskom, blender, *Sodium Dodecyl Sulphate Poliakrilamid Gel Electroforesis* (SDS-PAGE) dan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC).

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksploratif. Metode eksploratif bertujuan menghimpun informasi awal yang akan membantu upaya menetapkan masalah dan merumuskan hipotesis [13].

### **Penentuan konsentrasi protein dari ekstrak kasar khamir laut**

Penentuan konsentrasi enzim dari ekstrak kasar khamir laut menggunakan metode biuret dengan menambahkan larutan standar protein BSA. Prinsip kerja metode biuret adalah senyawa dengan 2 atau lebih ikatan peptide apabila direaksi dengan garam kupri dalam suasana basa akan membentuk warna violet. Reaksi biuret bergantung pada pembentukan suatu kompleks antara ion  $\text{Cu}^{++}$  dengan 4 atom N-peptida pada suasana basa, maka akan membentuk suatu kompleks warna ungu yang absorbansinya dapat dibaca pada panjang gelombang 540 nm. Pada metode ini digunakan BSA. Kelebihan BSA adalah harga yang lebih murah, larutan stabil pada pemanasan  $70^{\circ}\text{C}$  selama 30 menit, lebih spesifik karena 95% protein terdiri dari albumin. Adapun kelebihan metode biuret ini sendiri adalah lebih spesifik untuk peptide, polipeptida, dan protein, tidak bereaksi dengan ammonia, urea, dan senyawa nitrogen sederhana.

### **Penentuan aktivitas enzim dari ekstrak kasar khamir laut**

Penentuan aktivitas protease dari ekstrak kasar khamir laut metode kolorimetri pada panjang gelombang 650 nm menggunakan *Folin-phenol reagent*. Prinsip kerja penentuan aktivitas protease didasarkan pada pembentukan  $\text{Cu(II)}$ -protein, yang dalam suasana alkalis  $\text{Cu(II)}$  akan tereduksi menjadi  $\text{Cu(I)}$ . Ion  $\text{Cu}^{+}$  kemudian akan mereduksi *Folin-phenol reagent*, *phosphomolibdat-phosphotungstat* (*phosphomolybdotungstate*),

menghasilkan *heteropolymolybdenum blue* akibat reaksi oksidasi gugus aromatik (rantai samping asam amino) terkatalis  $\text{Cu}$ , yang memberikan warna biru intensif yang dapat dideteksi secara kolorimetri. Kekuatan warna biru terutama bergantung pada kandungan residu triptopan dan tirosin-nya dan dibaca pada panjang gelombang 650 nm.

### **Penentuan $V_{\text{maks}}$ dan $K_M$**

Prosedur pengukuran  $V_{\text{max}}$  dan  $K_M$  pada dasarnya sama dengan prosedur pengukuran konsentrasi protein dan aktivitas enzim, yaitu menggunakan standar protein dari tirosin dan BSA. Perbedaannya, pada pengukuran  $K_M$  dan  $V_{\text{max}}$  konsentrasi substrat ikan rucah yang digunakan bervariasi, yaitu: 0,5%, 0,25%, 0,16%, 0,125%, dan 0,1 %. Dalam menentukan  $K_M$  dan  $V_{\text{max}}$  digunakan persamaan Michaelis-Menten.

### **Hidrolisis daging ikan rucah**

Prinsip kerja hidrolisis protein adalah menghidrolisis protein dengan penambahan air untuk memotong ikatan peptide dan mempercepat sintesis peptide dalam pelarut organik dan pelarut tersebut mengandung air dengan tekanan rendah [14].

### **Karakteristik ekstrak kasar khamir laut dalam hidrolisis protein daging ikan rucah**

#### **1) Derajat Hidrolisis (DH)**

Derajat hidrolisis dapat didefinisikan sebagai perbandingan persen banyaknya ikatan peptide yang terpecah (N) terhadap total jumlah ikatan peptide per satuan massa (N total) [15].

#### **2) SDS-PAGE**

Prinsip dasar SDS-PAGE ini adalah denaturasi protein oleh *sodium dodecyl sulphate* yang dilanjutkan dengan pemisahan molekul berdasarkan berat molekulnya dengan metode elektroforesis yang menggunakan gel, dalam hal ini digunakan *polyacrylamide*. Uji berat molekul ini dilakukan pada sampel hidrolisat protein ikan rucah, ikan rucah yang tidak dihidrolisis dan marker sebagai pembanding.

### 3) Profil Asam-asam Amino (HPLC)

Profil asam-asam amino ditentukan menggunakan HPLC. Prinsip kerja HPLC adalah dansil klorida (5-dimetilamino-1-naftalen sulfonil klorida) digunakan untuk derivatisasi asam-asam amino, menghasilkan derivat dansil yang bersifat fluoresen, kemudian akan dipisahkan dengan prosedur kromatografi kolom fase dibalik (*reversed phase column chromatography*). Hasil yang diperoleh dideteksi dan diukur dengan suatu detektor fluoresen.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Karakteristik enzim dari ekstrak kasar khamir laut

Protease merupakan enzim yang digunakan untuk menghidrolisis protein menjadi senyawa yang lebih sederhana, yaitu asam-asam amino. Protease dari ekstrak kasar khamir laut merupakan bagian yang sangat penting sebagai agen penghidrolisis protein. Karakteristik protease dari ekstrak kasar khamir laut dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Karakteristik enzim

Karakteristik Protease	Kadar
Konsentrasi protein	2.217 mg/mL
Aktivitas protease	21.50 mU/menit/mL
Nilai $V_{maks}$	37.25 mmol L <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup>
Nilai $K_M$	$2.3 \times 10^3$ mM

### Aktivitas protease

Aktivitas protease merupakan jumlah unit mg protease/ mg protein. Satu unit aktivitas protease didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dapat menghasilkan satu  $\mu$ mol substrat per menit pada kondisi tertentu. Tabel 1. memperlihatkan aktivitas protease dari ekstrak khamir laut sebesar 21.50 mU/menit/mL. [16] melaporkan bahwa khamir laut (strain N11b) yang diisolasi dari air laut Antartika mempunyai aktivitas enzim sebesar 43.9 U/mg, khamir laut (strain YFO4C) yang diisolasi dari air laut Changdao, China sebesar 34.0 U/mg, khamir

laut (strain HN3.11) yang diisolasi dari air laut Qingdao, Cina sebesar 127.0 U/mg dan khamir laut (HN4.9) yang diisolasi dari sedimen pantai Qingdao, Cina sebesar 26.0 U/mg.

Berdasarkan perbandingan protease dari ekstrak kasar khamir laut dengan protease murni (alkaline protease) tersebut, menyatakan bahwa ekstrak kasar dari khamir laut yang digunakan dalam penelitian mempunyai aktivitas yang rendah dibandingkan dengan aktivitas protease khamir laut murni, hal ini dimungkinkan karena ekstrak khamir laut yang digunakan dalam penelitian ini merupakan ekstrak kasar khamir laut, yang masih terdapat banyak komponen yang mempunyai aktivitas katalitik rendah.

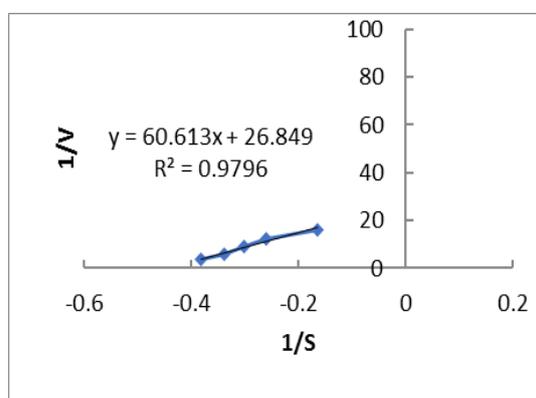
### Nilai $V_{maks}$ dan $K_M$

Hasil perhitungan penentuan nilai  $V_{maks}$  dan  $K_M$  protease dari ekstrak kasar khamir laut terhadap substrat (ekstrak daging ikan rucah) adalah sebesar 37.25 mmol L<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> dan nilai  $K_M$  yang diperoleh sebesar  $2.3 \times 10^3$  mM yang diperoleh dengan membuat transformasi linear dari persamaan Michaelis-Menten kedalam persamaan Lineweaver-Burk (Gambar 1). [17] melaporkan bahwa nilai  $V_{maks}$  dan  $K_M$  protease alkalin dari khamir laut (*A. pullulan* strain 10) yang dipurifikasi adalah 28.6 mmol/min/mg dan 0.25 mg/mL.

Berdasarkan perbandingan nilai  $V_{maks}$  dan  $K_M$  protease dari ekstrak kasar khamir laut pada substrat dengan protease murni menunjukkan bahwa protease ekstrak kasar khamir laut mempunyai nilai  $V_{maks}$  yang lebih kecil dan  $K_M$  lebih besar dari protease murni, hal ini dikarenakan protease yang digunakan dalam penelitian adalah protease kasar dari ekstrak khamir laut, dimana semakin rendah nilai  $K_M$  maka afinitas (kontak enzim dengan substrat) semakin tinggi. Jadi afinitas protease khamir laut yang digunakan penelitian mempunyai afinitas lebih rendah dibandingkan dengan protease murni dari khamir laut.

Sementara itu, nilai  $V_{maks}$  protease dari ekstrak khamir laut memiliki nilai  $V_{maks}$  lebih rendah dibandingkan protease murni dari

khamir laut (*A. pullulan* strain 10). Hal ini dimungkinkan karena protease dari ekstrak khamir laut merupakan ekstrak kasar sehingga nilai  $V_{maks}$ / kecepatan reaksi maksimal yang dihasilkan lebih rendah (lambat). [18] menjelaskan bahwa kinetika reaksi enzimatis sangat dipengaruhi oleh kemurnian substrat. Apabila substrat tidak murni, maka kinetika enzimatik akan berjalan lambat atau terhambat. Selain itu, enzim yang murni memungkinkan sisi-sisi aktifnya dapat bereaksi secara lebih baik, sehingga meningkatkan aktivitasnya yang berdampak pada penurunan nilai  $K_M$ .



Gambar 1. Grafik persamaan  $V_{maks}$  dan  $K_M$

### Karakteristik ekstrak kasar khamir laut dalam hidrolisis protein daging ikan rucah

Ikan rucah merupakan ikan yang memiliki nilai ekonomis rendah atau hasil samping pengolahan hasil perikanan. Di sisi lain, ikan adalah sumber protein hewani yang bergizi tinggi. Oleh karena itu, salah satu alternatif pengolahan ikan rucah dengan memanfaatkan sebagai produk hidrolisat protein ikan (HPI). Pada proses pembuatan HPI membutuhkan beberapa agen penghidrolisis, salah satunya adalah enzim protease. Enzim protease dapat diisolasi dari mikroorganisme, seperti khamir laut. Dalam hal ini, protease dari ekstrak kasar khamir laut sebagai agen penghidrolisis protein daging ikan rucah, yang bertujuan untuk meningkatkan ketersediaan nutrisi ikan rucah, dengan cara memotong ikatan peptida dari protein daging ikan rucah. Karakteristik HPI

dari ekstrak kasar khamir laut dapat dilihat pada Tabel 2.

### Derajat hidrolisis

Derajat hidrolisis merupakan tingkat pemecahan protein menjadi senyawa berantai pendek, yang diukur dari perbandingan  $\alpha$ -amino nitrogen dengan total nitrogen (AN/TN), maka dengan semakin tinggi tingkat pemecahan protein menjadi senyawa berantai pendek termasuk senyawa  $\alpha$ -amino nitrogen, derajat hidrolisisnya menjadi semakin tinggi. Sebaliknya, semakin kecil tingkat pemecahan protein menjadi senyawa berantai pendek, derajat hidrolisisnya menjadi semakin rendah. Tabel 2 memperlihatkan bahwa nilai derajat hidrolisis daging ikan rucah yang dihidrolisis dengan ekstrak kasar khamir laut adalah 11.31, 14.16, 15.88, dan 22.35%. Kurva hidrolisis daging ikan rucah dengan ekstrak kasar khamir laut setelah 100 menit dapat dilihat pada Gambar 2.

Gambar 2 memperlihatkan prosentase derajat hidrolisis mengalami peningkatan sebanding dengan lama (waktu) hidrolisis, hal ini disebabkan oleh aktivitas enzim dari ekstrak khamir laut menghidrolisis ikatan peptida pada substrat (daging ikan rucah) yang disebut sebagai fase cepat awal. Setelah melewati fase cepat awal (*initial rapid phase*) hidrolisis, tingkat hidrolisis akan cenderung menurun, yaitu masuk pada fase statis (*stationary phase*). Hasil ini sama dengan penelitian [19] dengan ikan lemuru, [20] dengan ikan salmon, and [21] dengan ikan tuna sirip kuning. Penurunan hidrolisis pada reaksi enzimatis disebabkan adanya inhibisi (penghambatan) enzim oleh produk yang terbentuk pada derajat hidrolisis yang tinggi. Produk tersebut aktif sebagai kompetitor substrat yang efektif.

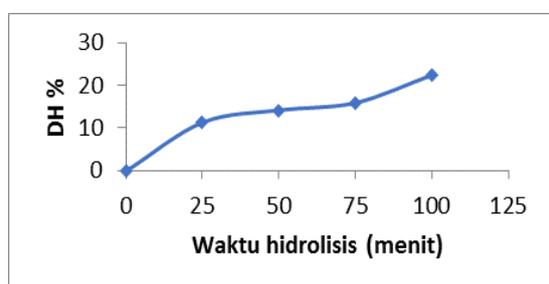
Derajat hidrolisis protein daging ikan rucah dengan penghidrolisis ekstrak kasar khamir laut tertinggi sebesar 22.35% dapat dilihat pada Tabel 5. [22] melaporkan bahwa derajat hidrolisis ikan layang (*Decapterus maruadsi*) dengan menggunakan protease (*Flavourzyme*) mencapai 60%. Derajat hidrol-

Tabel 2. Karakteristik HPI

Derajat Hidrolisis (%)				
0 menit	25 menit	50 menit	75 menit	100 menit
0	11.31	14.16	15.88	22.35
SDS-PAGE (kDa)				
Unhydrolysed		Hydrolysed		
	47.63		47.63	
	40.74		40.74	
	24.21		24.21	
	17.72		17.72	
			14.39	
HPLC				
Asam Amino	Hidrolisat	Skor NRC*	Skor WHO/FAO**	
Aspartat	0.290014	-	-	
Glutamat	0.273384	-	-	
Serin	0.078943	-	-	
Histidin	-	-	-	
Glisin	0.211072	-	-	
Arginin	0.07998	0.06105	0.01599	
Alanin	0.099884	-	-	
Tirosin	0.09538	-	-	
Metionin	0.187196	0.06038	0.05348	
Valin	-	-	-	
Fenilalani	0.135626	0.02086	0.03161	
Isoleusin	0.122577	0.04903	0.03064	
Leusin	0.222365	0.06738	0.03176	
Lisin	0.654233	0.11477	0.11895	

\*) NRC merupakan referensi kebutuhan asam amino esensial untuk ikan

\*\*) WHO/ FAO merupakan referensi kebutuhan asam amino esensial untuk pangan



Gambar 2. Kurva derajat hidrolisis protein daging ikan rucah

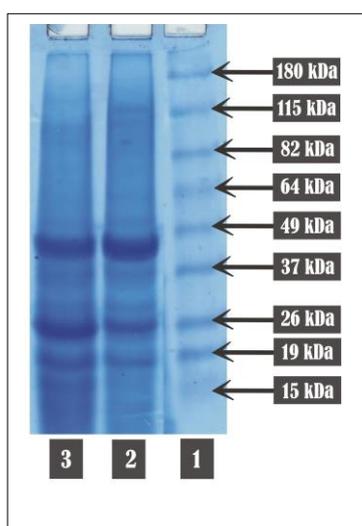
-isis daging ikan rucah dengan protease dari ekstrak khamir laut lebih rendah dari derajat hidrolisis ikan layang dengan protease murni,

hal ini dimungkinkan karena protease dari ekstrak kasar khamir laut yang digunakan sebagai penghidrolisis merupakan ekstrak kasar dari khamir laut sehingga aktivitas enzim yang dihasilkan rendah, dimana hal ini sebanding dengan hasil uji aktivitas enzim dari ekstrak khamir laut yang rendah.

Derajat hidrolisis protein daging ikan rucah dengan menggunakan ekstrak kasar khamir laut mempunyai nilai jauh lebih rendah dibandingkan dengan protease murni, hal ini sebanding dengan tingginya nilai  $K_M$  protease dari ekstrak kasar khamir laut (Tabel 2), artinya derajat hidrolisis sangat berhubungan dengan nilai  $K_M$  enzim yang menghidrolisis.

[23] melaporkan bahwa tiga perlakuan hidrolisis polipeptida yang dikatalisis oleh alkalase pada suhu 50°C dan pH 9.5, memiliki nilai (DH 10%,  $K_M$  5.5 ± 1.0 mM; DH 15%,  $K_M$  4.9 ± 0.4 mM; dan DH 20%,  $K_M$  4.0 ± 0.8 mM), artinya semakin tinggi DH maka  $K_M$  semakin kecil, sehingga afinitas semakin tinggi. Jadi protease dari ekstrak khamir laut mempunyai afinitas yang rendah sehingga derajat hidrolisis yang dihasilkan juga rendah.

### SDS-PAGE



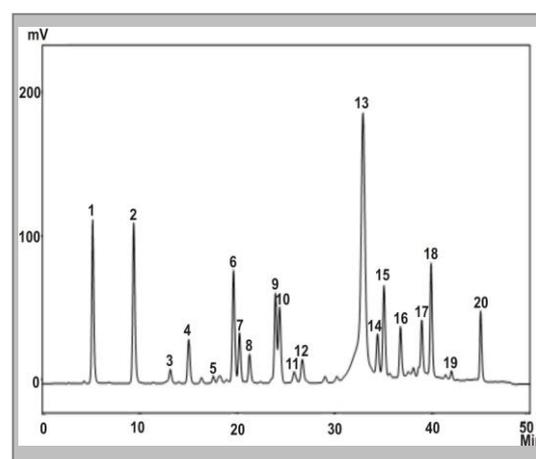
Gambar 3. Profil SDS-PAGE protein daging ikan rucah, dimana (lajur 1) marker berat molekul, (lajur 2) protein daging ikan rucah yang tidak dihidrolisis (kontrol), dan (lajur 3) protein daging ikan rucah yang dihidrolisis

Berdasarkan hasil analisis SDS-PAGE pada sampel ekstrak ikan rucah (*unhydrolysed*) didapatkan 4 pita, yaitu 47.63, 40.74, 24.21, dan 17.72 kDa sedangkan hidolisis daging ikan rucah dengan ekstrak kasar khamir laut (*hydrolysed*) didapatkan 5 pita yaitu 47.63, 40.74, 24.21, 17.72, dan 14.39 kDa, seperti yang terlihat pada Gambar 3. Hal tersebut menunjukkan bahwa ekstrak kasar khamir laut mampu menghidrolisis daging ikan rucah sehingga mampu memecah ikatan peptida menjadi peptida yang memiliki berat molekul lebih rendah dan pita yang dihasilkan juga lebih banyak dan lebih tipis. [24] melaporkan bahwa hidrolisat ikan hering dengan menggunakan alkalase mempunyai berat molekul 6.5 kDa sedangkan tanpa

hidrolisis (*unhydrolysed*) 45-20 kDa. Selain itu, [12] melaporkan bahwa hidrolisat protein ikan salmon dengan menggunakan alkalase memiliki berat molekul 8 kDa.

### Profil asam amino

Profil asam amino hidrolisat daging ikan rucah yang dihidrolisis dengan protease dari ekstrak khamir laut menggunakan uji HPLC. Hasil uji HPLC hidrolisat daging ikan rucah dapat dilihat pada kromatogram asam amino hidrolisat daging ikan rucah pada Gambar 4. berikut ini :



Gambar 4. Kromatogram HPLC hidrolisis protein daging ikan rucah

Komposisi asam amino hidrolisat daging ikan rucah dalam 100 gram sampel uji ditunjukkan pada Tabel 2. Hidrolisat daging ikan rucah dengan ekstrak khamir laut mengandung asam-asam amino, baik essential maupun non essential. Kandungan asam amino dari hasil hidrolisis daging ikan rucah dengan ekstrak kasar khamir laut sangat rendah, hal ini dimungkinkan karena ekstrak khamir laut yang digunakan sebagai penghidrolisis adalah dalam keadaan kasar (ekstrak kasar). Selain itu, hidrolisat protein daging ikan rucah yang digunakan untuk uji HPLC dalam keadaan cair, sehingga masih banyak kadar airnya. [22] melaporkan bahwa hidrolisat ikan layang yang telah dikeringkan (*freeze drying*) mempunyai kandungan asam amino yang sempurna dengan total asam amino 100.11%.

Tabel 2. juga memperlihatkan bahwa kandungan asam amino esensial dari hasil

hidrolisis daging ikan rucah dengan ekstrak khamir laut sangat rendah, sehingga kurang memenuhi standar FAO/WHO untuk pangan dan NRC untuk pakan ikan, yang direkomendasikan. Hasil analisis skor asam amino esensial dari hidrolisat daging ikan rucah yang dibandingkan dengan standar FAO/WHO untuk pangan dan NRC untuk pakan ikan adalah kurang dari 1 (satu), artinya hidrolisat daging ikan rucah dengan ekstrak kasar khamir laut belum memenuhi standar FAO/WHO sebagai pangan (manusia) dan NRC sebagai pakan ikan.

Protease yang digunakan sebagai penghidrolisis daging ikan rucah merupakan protease alkalin (alkalase), karena pengkondisian pH optimumnya adalah pH 9 dengan suhu optimum 45°C. [4] melaporkan bahwa ekstrak protease khamir laut strain 10 yang diisolasi dari laut Cina memiliki aktivitas optimum pada pH 9 dan suhu 45°C. [25] menyatakan bahwa alkalase merupakan protease endopeptidase yang termasuk golongan protease serin, yang memotong ikatan bagian dalam rantai peptida yang mempunyai sisi aktif fenilalanin, tirosin dan leusin. Berdasarkan hasil uji asam amino daging ikan rucah yang dihidrolisis dengan protease dari ekstrak khamir laut didapatkan kandungan fenilalanin 0.135%, tirosin 0.095% dan leusin 0.222% (Tabel 2). Hal ini dimungkinkan bahwa alkalase dari ekstrak khamir laut melakukan pemotongan ikan peptida pada bagian tripeptida maupun dipeptida sehingga kandungan fenilalanin dan leusin masih cukup tinggi dibandingkan dengan serin, arginin, alanin dan isoleusin. Selain itu, kandungan tirosin juga lebih tinggi dari serin dan arginin.

Rendahnya asam amino yang dihidrolisis oleh protease dari ekstrak khamir laut juga ditunjukkan pada hasil SDS-PAGE yang hanya terjadi penambahan satu pita dengan berat molekul sebesar 14.39 kDa. [26] melaporkan hidrolisat viseral ikan mas (*Catla catla*) mempunyai peptida berat molekul rendah (<8 kDa) yang mempunyai nilai nutrisi tinggi dan dapat digunakan secara efektif sebagai sumber nitrogen pada media pertumbuhan bakteri.

## KESIMPULAN

Penelitian tentang karakteristik ekstrak kasar khamir laut dalam hidrolisis protein daging ikan rucah ini dapat disimpulkan, sebagai berikut :

- Karakteristik enzim dari ekstrak khamir laut meliputi konsentrasi protein, aktivitas protease, kecepatan maksimal ( $V_{maks}$ ) dan konstanta Michaelis-Menten ( $K_M$ ). Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai konsentrasi protein sebesar 2.217 mg/mL, aktivitas protease sebesar 21.50 mU/menit/mL, nilai  $V_{maks}$  sebesar 37.25 mmol/L/menit dan nilai  $K_M$  sebesar  $2.3 \times 10^3$  mM, dimana hasil karakteristik enzim dari ekstrak protease mempunyai aktivitas yang rendah yang menyebabkan afinitas enzim terhadap substrat juga rendah.
- Karakteristik ekstrak kasar khamir laut dalam hidrolisis protein daging ikan rucah meliputi derajat hidrolisis, profil asam amino, dan berat molekul (SDS-PAGE). Nilai karakteristik hidrolisis daging ikan rucah yaitu derajat hidrolisis tertinggi sebesar 22.35%, kandungan asam amino total sebesar 1.32% dan berat molekul 14.39 kDa, dimana hasil karakteristik hidrolisis daging ikan rucah menunjukkan bahwa aktivitas protease dari ekstrak khamir laut mempunyai aktivitas yang rendah, hal ini dimungkinkan karena protease yang digunakan untuk menghidrolisis merupakan ekstrak kasar.

Dalam penelitian ini dapat disarankan bahwa penggunaan ekstrak kasar dari khamir laut sebagai agen penghidrolisis protein daging ikan rucah perlu ditingkatkan aktivitasnya, dengan melakukan penelitian tentang ekstrak murni dari khamir laut. Sehingga aktivitas protease yang dihasilkan untuk menghidrolisis protein daging ikan rucah lebih tinggi.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terimakasih disampaikan kepada Tim Peneliti khamir laut yang telah membantu dalam menjalankan penelitian.

## DAFTAR PUSTAKA

- Biochemical, and Functional Properties'. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 40, 43. 2000.
- [1] K. Kodama, K. Takahashi, K. Kodama, J. Nishikawa, T. Kakuta, H. Iefuji, S. Okada, H. Momose, M. Kozaki, and M. Suzuki. There are various yeast in nature. In "A Challenge from Yeast," eds. Tamura, G., Noshiro, K., Akiyama, H., and Koizumi, T., Gihoudou Publication, Tokyo, pp. 13-108, 1999.
- [2] Faharudin. "Analisa protein Pada Proses Pembuatan Hidrolisat Protein Ikan Peperek (*Liognathos, sp*) Dengan Starter Marine Yeast". F. Perikanan dan Ilmu Kelautan Univ. Brawijaya. Malang. 2002. (tidak diterbitkan).
- [3] E. Waloyo dan Sukoso. "Analisa Lemak Pada Proses Pembuatan Hidrolisat Protein Ikan Peperek (*Liognathos, sp*) Dengan Starter Marine Yeast". Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya. Malang. 2004 (tidak diterbitkan)
- [4] W. Ping, C. Zhenming, M. A. Chunling, "Alkaline Protease Production by a strain of Marine Yeast". Jour. of Ocean University of China (English Edition), 5(3): 263-268, 2006.
- [5] Q. K. Beg, V. Sahai, and R. Gupta, "Statistical Media Optimization and Alkaline Protease Production from *Bacillus mojavensis* in a Bioreactor". Process Biochemistry, 39, 203. 2003.
- [6] S. I. Aspomo, S. J. Horn, and V. G. H. Eijsink, "Enzymatic Hydrolysis of Atlantic Cod (*Gadusmorhua* L.) Viscera". Process Biochem. 40. 2005.
- [7] W. J. Lahl, and S. D. Braun, "Enzymatic Production of Protein Hydrolyzates for Food Use". Food Technol., 48 (10), 68. 1994.
- [8] H. G. Kristiansson, and G. A. Rasco, "Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional Properties'. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 40, 43. 2000.
- [9] L. Assadad, A. R. Hakim, dan T. N. Widiyanto. "Mutu Tepung Ikan Rucah pada Berbagai Proses Pengolahan". Semnas XII Hasil Penelitian Perikanan dan Kelautan. 2015
- [10] Gildberg, I. Batista, and E. Strom. "Preparation and Characterization of Peptones Obtained by A Two-Step Enzymatic Hydrolysis of Whole Fish". Biotechnol. Appl. Biochem. 11, 413-423. 1989.
- [11] F. Ariyani, Saleh, M. Tazwir dan H. Nuruk. "Optimasi Proses Produksi Hidrolisat Protein Ikan (HPI) Dari Ikan Mujair (*Oreochromis mossambicus*)". Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia Volume 9 Nomor 5. 2003.
- [12] S. Sathivel, S. Smiley, W. Prinyawiwatkul, and Peter. "Functional and Nutritional Properties of Red Salmon Enzymatic Hydrolysates". J. Food Sci., 70, 401. 2005.
- [13] T. M. Amirin. Penelitian eksploratori (eksploratif). Yogyakarta: Ekonisia Fakultas Ekonomi UII. 2009.
- [14] B. Sookkheo, S. Sinchaikul, S. Phutrakul, and S. Chen,. "Purification and Characterization of The Highly Thermostable Proteases from *Bacillus stearothermophilus* TLS33". Protein Expression and Purification, 20, 142. 2000.
- [15] N. Soussi, A. Bougatef, Y. Triki-Ellouz, and M. Nasri, "Biochemical and Functional Properties of Sardinella (*Sardinella aurita*) By-product Hydrolysates". Laboratoire de Génie Enzymatique et de Microbiologie, Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax, Tunisia ISSN 1330-9862. 2006.

- [16] J. Li, Z. Chi, X. Wang, and Z. Chi. "The selection of alkaline protease-producing yeasts from marine environments and evaluation of their bioactive peptide production". Chinese Journal of Oceanology and Limnology 27 (4): 753-761. 2009.
- [17] C. Ma, Xiumei Ni, Zhenming Chi, L. Ma, and L. Gao. "Purification and Characterization of an Alkaline Protease from the Marine Yeast *Aureobasidium pullulans* for Bioactive Peptide Production from Different Sources". Journal of Marine Biotechnology. 2007.
- [18] S. Ketaren. "Kinetika Reaksi Biokimia. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan." Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi PAU Bioteknologi. IPB, Bogor. 1990.
- [19] G.B. Quaglia and E. Orban, "Enzymic solubilisation of proteins of sardine (*Sardina pilchardus*) by commercial proteases". J. Sci. Food Agric. 38 (1987) 263–269
- [20] H. G. Kristiansson and G. A. Rasco. "Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional Properties". Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 40, 43. 2000.
- [21] Gildberg, I. Batista, and E. Strom. "Preparation and Characterization of Peptones Obtained by A Two-Step Enzymatic Hydrolysis of Whole Fish". Biotechnol. Appl. Biochem. 11, 413–423. 1989.
- [22] Y. Thiansilakul, S. Benjakul, and F. Shahidi. "Compositions, Functional Properties and Antioxidative Activity of Protein Hydrolysates Prepared from Round Scad (*Decapterus maruadsi*)". Journal of food chemistry, 103, 1385-1394. 2006.
- [23] P. W. Tardioli, R. Sousa, C. Roberto, Giordano, and L. C. Raquel. "Kinetic Model of The Hydrolysis of Polypeptides Catalyzed by Alcalase® Immobilized on 10% Glyoxyl-Agarose". Journal of Enzyme and Microbial Technology, 36, 555–564. 2005.
- [24] A. M. Gesualdo, and E. C. Y. Li-Chan. "Functional Properties of Fish Protein Hydrolysate from Herring (*Clupea harengus*)". J. Food Sci., Volume 64, No. 6. 1999.
- [25] M. B. Rao, A. M. Tanksale, S. G. Mohini, and V. V. Deshpande. "Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases". Microbiology and Molecular Biology Reviews, 62, 597. 1998.
- [26] N. Bhaskar, and N. S. Mahendrakar, "Protein Hydrolysate from Visceral Waste Proteins of Catla (*Catla catla*): Optimization of Hydrolysis Conditions for a Commercial Neutral Protease". Journal of Bioresource Technology, 99, 4105–4111. 2008.