

4 PEMBAHASAN

4.1 Isolat Protein

Isolasi protein yang digunakan dalam penelitian ini adalah *salting out*. Berdasarkan Tabel 2 dapat dilihat bahwa hasil berat isolat protein yang didapatkan dari 34 g *Gracilaria* sp. kering dengan metode *salting out* adalah 2,575 g atau 7,60%. Kemudian, hasil isolat tersebut digunakan untuk pengukuran kadar protein dengan metode *Bradford* dan ekstraksi asam glutamat menggunakan enzim bromelin. Pada Tabel 3 dapat dilihat bahwa hasil pengukuran kadar protein *Gracilaria* sp. menggunakan *Bradford* adalah 62,67 mg/g berat kering. Hasil tersebut lebih kecil daripada kadar protein yang didapatkan oleh Luistro *et al.* (1987) melalui hidrolisis asam dan *Kjeldahl* yaitu 14,78% (*Gracilaria coronopifolia*) dan 28,70% (*Gracilaria verrucosa*) serta Kazir *et al.* (2019) yang menggunakan metode *ion exchange* dan *Kjeldahl* sebesar 24,8% berat kering (*Gracilaria* sp.). Namun, hasil tersebut lebih besar daripada kandungan protein yang diperoleh Sumayya *et al.* (2018) yang mendapatkan 4,7 mg/g berat basah (*G. corticata* var. *cylindrical*) dengan metode hidrolisis asam dan *Lowry*.

Perbedaan tersebut dapat terjadi karena adanya perbedaan metode yang digunakan. Metode *Bradford* adalah metode pengukuran kadar protein total dengan menggunakan pewarna *Coomassie Brilliant Blue (CBB)* yang mengikat asam amino dengan rantai samping tirosin, triptofan, fenilalanin, arginin, histidin dan leusin (Kruger, 2002; Purwanto, 2014, Utami *et al.*, 2016). Metode *Bradford* lebih stabil daripada metode *Biuret*, *Lowry* dan *Kjeldahl*. Hal tersebut dibuktikan dari tidak adanya pengaruh dengan keberadaan pengotor seperti ammonium sulfat saat pembacaan absorbansi, sehingga hasil kadar protein yang didapatkan lebih rendah daripada *Kjeldahl* (Purwanto, 2014).

Dibandingkan dengan *Bradford*, metode *Kjeldahl* digunakan untuk mengukur protein kasar pada suatu bahan secara tidak langsung. Pengukuran pada metode *Kjeldahl* berdasarkan jumlah nitrogen yang terdapat pada protein bahan tersebut. Oleh karena itu terkadang dalam pengukuran protein menggunakan *Kjeldahl*, nitrogen selain protein juga ikut terhitung (Utami *et al.*, 2016). *Kjeldahl* juga memiliki kelemahan yaitu tidak stabil terhadap keberadaan pengotor seperti ammonium sulfat (Purwanto, 2014).

Jika *Bradford* menghitung protein total dan *Kjeldahl* menghitung protein berdasarkan total N, maka berbeda juga untuk *Lowry*. Metode *Lowry* menggunakan reagen Folin-Ciocalteu yang akan direduksi oleh ion Cu^+ dan akan membentuk warna biru. Ion Cu^+ sendiri berasal dari senyawa kompleks Cu (II)-protein yang tereduksi menjadi Cu(I) dalam suasana alkalis. Warna biru yang terbentuk adalah akibat dari reaksi oksidasi gugus aromatik yang terkatalis oleh Cu. Namun kekuatan dari warna biru tersebut sangat bergantung pada kandungan residu triptofan dan tirosinnya, sehingga hasil kadar protein menggunakan *Bradford* lebih tinggi daripada *Lowry* (Purwanto, 2014).

Salting out adalah cara yang paling umum digunakan untuk mengendapkan protein. Selain itu, garam yang digunakan dalam *salting out* dapat membantu menstabilkan protein terhadap denaturasi dan kontaminasi bakteri (Harris & Angal, 1989). Prinsip kerja dari *salting out* ini adalah mendehidrasi molekul protein. Ketika garam ditambahkan kedalam larutan maka garam akan mengikat air sehingga menurunkan ketersediaan air yang mengikat protein dan akibat dari kekurangan air atau ketika larutan sudah sangat jenuh maka protein didalam larutan tersebut akan mengendap (Harris & Angal, 1989; Rosenberg, 2005). Garam yang digunakan dalam penelitian ini adalah ammonium sulfat.

Ammonium sulfat dipilih karena murah, larut pada suhu rendah, fleksibel terhadap berbagai pH dan mudah larut dibandingkan garam lainnya sehingga memudahkan saat pemisahan dengan endapan protein menggunakan sentrifugasi. Penambahan ammonium sulfat dilakukan secara perlahan dan dalam keadaan dingin, pengadukan larutan juga harus diperhatikan agar tidak menimbulkan busa yang berlebihan. Busa yang berlebihan dapat menyebabkan denaturasi protein (Harris & Angal, 1989).

Selain *salting out*, isolat protein dari *Gracilaria* sp. juga dapat dihasilkan melalui hidrolisis asam (Luistro *et al.*, 1987; Sumayya *et al.*, 2018) dan *ion exchange* (Kazir *et al.*, 2019). Hidrolisis asam adalah salah satu cara untuk mengendapkan protein dengan proses denaturasi. Proses ini dilakukan dengan cara menambahkan larutan asam (umumnya asam sulfat atau asam klorida) yang memiliki pH ekstrim. Akibat dari pH ekstrim yang ditambahkan, maka muatan ion pada rantai samping asam amino akan

berubah sehingga menyebabkan terbukanya rantai protein dan terjadi denaturasi (Harris & S. Angal, 1989). Hidrolisis asam dapat menghasilkan asam amino bebas dalam jumlah besar dan menghidrolisis berbagai macam protein. Oleh karena itu, hasil hidrolisis protein menggunakan asam lebih tinggi dibandingkan dengan *salting out*. Tetapi, metode ini memberikan efek yang berbeda terhadap setiap asam amino contohnya, asparagin dan glutamin akan terhidrolisis seluruhnya menjadi asam aspartat dan asam glutamat sedangkan triptofan akan hilang total. (Alvarez *et al.*, 2012). Namun, setelah proses hidrolisis asam ini selesai maka akan meninggalkan garam dan senyawa karsinogenik didalam sampel (Alvarez *et al.*, 2012; Laohakunjit *et al.*, 2014).

Metode *ion exchange* adalah metode isolasi protein berdasarkan pemisahan muatan positif dan negatif pada rantai samping asam aminonya. Muatan positif terdiri dari histidin, lisin, arginin, dan gugus amino pada N-terminal, sedangkan ion negatif terdiri dari aspartat, glutamat dan gugus karboksil dari C-terminal. Protein memiliki pH isoelektrik (pI) antara 5-9. Apabila pH sebuah protein diatas pI maka protein tersebut akan bermuatan negatif dan jika dibawah pI akan bermuatan positif. Prinsip dari metode ini adalah menggunakan suatu matriks penukar ion yang dapat mengikat secara kovalen gugus fungsi bermuatan negatif pada penukar kation atau gugus fungsi yang bermuatan positif pada penukar anion (Harris & Angal, 1989). Menurut Kazir *et al.* (2019) metode *ion exchange* merupakan cara yang dapat dilakukan untuk mendapatkan hasil isolat protein yang tinggi dan sesuai untuk mendapatkan produk yang “*food grade*”.

Selain metode isolasi dan pengukuran, kandungan nutrisi didalam *Gracilaria sp.* juga dipengaruhi oleh kondisi, letak tempat tumbuhnya dan spesiesnya (Handayani, 2006; Rohman *et al.*, 2018). Contohnya hasil kadar protein yang didapatkan oleh Luistro *et al.* (1987) yang mendapatkan *Gracilaria coronopifolia* dan *Gracilaria verrucosa* dari Filipina, Sumayya *et al.* (2018) memperoleh *Gracilaria corticata* var. *cylindrica* dari India serta *Gracilaria sp.* yang didapatkan oleh Kazir *et al.* (2019) dari Israel. Secara umum kadar tertinggi protein rumput laut akan didapatkan saat musim dingin dan semi, sedangkan musim panas adalah yang terendah (Handayani, 2006). Selain itu, menurut Rohman *et al.* (2018) *Gracilaria sp.* hidup dengan cara fotosintesis dan menyerap nutrisi dari perairan sekitarnya, sehingga gerakan air, suhu, kadar garam dan pencahayaan

matahari yang masuk pada lokasi pertumbuhan mempengaruhi hasil kandungan nutrisinya.

Isolat protein yang terbentuk dari hasil *salting out* akan dikeringkan dengan metode *freeze drying*. *Freeze drying* adalah metode pengeringan yang bertujuan untuk mengurangi kadar air suatu bahan atau sampel dengan menggunakan prinsip vakum (Martiansyah & Riza, 2017). Menurut Castañeda-Saucedo *et al.* (2014) *freeze drying* dilakukan dengan cara pengeringan bahan dengan suhu yang sangat rendah dan disertai dengan modifikasi pada tekanan udara untuk menciptakan kondisi vakum sehingga pemisahan air dari bahan berdasarkan prinsip sublimasi. Metode ini dapat digunakan untuk pengawetan sampel protein, mikroba, obat-obatan, plasma darah dan jaringan tanaman agar dapat disimpan dalam waktu lama dan pendistribusian tanpa merusak sel yang akan dianalisa. Manfaat dari *freeze drying* selain untuk penyimpanan dan distribusi yaitu dapat menghindari kerusakan pada sampel akibat panas (umumnya metode pengeringan yang lain menggunakan panas) dan mencegah perubahan konsentrasi pada sampel protein setelah *salting out* (Martiansyah & Riza, 2017).

4.2 Kadar Asam Glutamat *Gracilaria* sp.

Dalam penelitian ini ekstraksi asam glutamat pada *Gracilaria* sp. dilakukan dengan menggunakan enzim bromelin. Dari Tabel 4 dan 5 dapat dilihat bahwa semakin lama waktu inkubasi pada konsentrasi enzim bromelin 5% dan 10% akan mengalami kenaikan hasil kadar asam glutamat pada *Gracilaria* sp., sehingga dengan perlakuan-perlakuan tersebut belum ditemukan titik optimal untuk ekstraksi asam glutamat *Gracilaria* sp. dengan enzim bromelin. Namun, hal tersebut sesuai karena semakin lama waktu inkubasi yang dilakukan maka kerja enzim untuk menghidrolisis akan semakin panjang sehingga semakin banyak ikatan peptida yang terhidrolisis (Wijaya & Yuniarta, 2015). Walaupun secara keseluruhan menunjukkan kenaikan, tetapi hasil kadar asam glutamat pada konsentrasi 5% lebih tinggi daripada 10% (lihat Gambar 4). Hal tersebut kurang sesuai dengan pernyataan Laohakunjit *et al.* (2014) bahwa % derajat hidrosilat protein dari *Gracilaria fisheri* akan mengalami kenaikan secara signifikan pada konsentrasi enzim 5-10%. Selain itu, hasil % derajat hidrosilat protein tertinggi didapatkan dengan menggunakan enzim bromelin sebanyak 10% dan waktu inkubasi selama 3 jam.

Ketidaksesuaian tersebut dapat terjadi karena adanya perbedaan aktivitas enzim yang digunakan, sumber dari enzim bromelin itu sendiri dan jumlah konsentrasi enzim yang digunakan (Masri, 2014; Wijaya & Yunianta, 2015).

Aktivitas enzim bromelin yang digunakan dalam penelitian ini adalah 50.000 u/g, sedangkan yang digunakan didalam Laohakunjit *et al.* (2014) adalah 119.325 u/g. Pada Tabel 4 dan 5 dapat dilihat bahwa hasil tertinggi kadar asam glutamat yang diperoleh dari *Gracilaria* sp. adalah $2,25 \cdot 10^{-3}$ mg/g *dry seaweed* atau $2,97 \cdot 10^{-2}$ mg/g isolat protein (5% enzim bromelin dan waktu inkubasi selama 5 jam). Hasil tersebut kurang sesuai dengan kadar asam glutamat *Gracilaria fisheri* yang didapatkan oleh Laohakunjit *et al.* (2014) yaitu 46,7 mg/100 g protein. Ketidaksesuaian ini terjadi karena menurut Masri (2014) aktivitas enzim bromelin tertentu akan bekerja maksimal pada pH tertentu juga. Ketika pH lingkungan sekitar enzim bromelin lebih rendah atau tinggi dari pada pH optimalnya maka aktivitas enzimnya juga akan menurun. pH optimum dari enzim bromelin adalah 6-7. Namun, secara umum pH optimalnya adalah 7. Selain itu, semakin tinggi konsentrasi enzim bromelin yang ditambahkan menyebabkan pH larutan tersebut semakin tinggi juga (Wijaya & Yunianta, 2015).

Semakin tinggi konsentrasi enzim yang digunakan maka semakin banyak protein yang terdegradasi menjadi asam amino, sehingga nitrogen terlarut didalam larutan juga semakin tinggi. Nitrogen terlarut didalam larutan yang semakin tinggi dapat menyebabkan kenaikan pH (Wijaya & Yunianta, 2015) dan hal tersebut dapat menurunkan aktivitas enzim itu sendiri (Masri, 2014).

Secara komersial terdapat dua enzim proteolitik yang dapat digunakan untuk memecah protein yaitu enzim bromelin dan enzim papain. Enzim bromelin adalah enzim proteolitik yang diekstrak dari nanas. Bromelin berbentuk serbuk amori yang berwarna putih kekuningan dan berbau khas (Masri, 2014). Menurut Laohakunjit *et al.* (2014), bromelin berpotensi untuk memproduksi hidrolisat protein karena aktivitas spesifiknya yang luas untuk memotong ikatan peptida dan khususnya sistein endopeptidase akan memotong ikatan peptida pada gugus karbonil seperti yang ada pada arginin, fenilalanin dan tirosin (Masri, 2014). Selain itu, enzim bromelin dapat memecah glukagon pada ikatan arginin-

alanin dan ikatan alanin-asam glutamat sehingga asam glutamat, asam aspartat, lisin dan arginin terlepas dari sisi P1 (Arshad *et al.*, 2014). Menurut Kazir *et al.* (2019) *Gracilaria* sp. mengandung asam amino alanin, arginin, asam aspartat, sistein, asam glutamat, glisin, histidin, isoleusin, leusin, metionin, fenilalanin, prolin, serin, threonin, tirosin dan valin. Oleh karena itu, enzim bromelin dapat digunakan untuk mengekstrak asam glutamat dari *Gracilaria* sp. karena *seaweed* ini memiliki substrat yang sesuai untuk enzim bromelin. Hal ini sudah dibuktikan oleh Laohakunjit *et al.* (2014) bahwa hidrolisis protein menggunakan enzim bromelin menghasilkan kandungan asam glutamat yang cukup tinggi dibandingkan dengan asam amino lainnya. Selain itu, hidrolisis dengan enzim bromelin terbukti dapat mempertahankan aroma *seafood* serta rasa rumput laut sehingga bias digunakan sebagai prekursor dalam *food enhancer* untuk memberikan rasa *seafood*/umami (Laohakunjit *et al.*, 2014).

Enzim papain adalah enzim proteolitik yang berasal dari getah papaya dan termasuk dalam golongan sistein peptidase (endopeptidase) yang akan menghidrolisis gugus thiol pada sistein (Salamah *et al.*, 2012). Papain yang komersial berbentuk serbuk putih kekuningan. Sebagai enzim proteolitik, papain juga berfungsi untuk memecah ikatan peptida, polipeptida dan protein dengan reaksi hidrolisis menjadi asam amino dan peptida rantai pendek. Selain itu, papain memiliki kelebihan dibandingkan dengan bromelin yaitu lebih tahan terhadap proses suhu (stabil pada suhu 40°C-60°C), mempunyai rentang pH optimum yang luas (5-7,5) dan lebih murni (Budiman, 2016). Namun, menurut Wijaya & Yuniarta (2015) enzim papain yang digunakan untuk mengempukan daging dapat meningkatkan rasa pahit pada daging tersebut. Oleh sebab itu, pada penelitian ini digunakan enzim bromelin untuk mengekstrak asam glutamat dari *Gracilaria* sp. karena keunggulan bromelin yang dapat mempertahankan rasa rumput laut dan aroma *seafood* (Laohakunjit *et al.*, 2014)

Konsentrasi enzim bromelin yang diberikan dalam penelitian ini adalah 5% dan 10% dengan waktu inkubasi selama 1, 3 dan 5 jam. Hal ini berdasarkan hasil penelitian dari Laohakunjit *et al.* (2014) bahwa pada konsentrasi enzim bromelin 5%-10% menunjukkan hasil kenaikan % derajat hidrolisat protein yang signifikan, sedangkan dengan konsentrasi 15-20% tidak memberikan perbedaan hasil yang signifikan akibat sudah

jenuhnya substrat/ enzim/ adanya efek inhibitor. Namun, rentang optimasi ditunjukkan pada hasil dari konsentrasi enzim 10-20% dengan waktu inkubasi 3-12 jam. Hal tersebut sesuai dengan hasil yang didapatkan pada Tabel 4 dan 5 yaitu selama waktu inkubasi 1 jam dengan konsentrasi enzim bromelin yang berbeda tidak menunjukkan perbedaan yang nyata, tetapi dengan waktu inkubasi 3 dan 5 jam ada perbedaan yang nyata. Selain itu, hasil kadar asam glutamat pada kedua konsentrasi tidak menunjukkan penurunan seiringnya waktu inkubasi. Hal itu ini disebabkan karena semakin lama waktu inkubasi yang dilakukan maka kerja enzim untuk menghidrolisis akan semakin panjang sehingga semakin banyak ikatan peptida yang terhidrolisis (Wijaya & Yuniarta, 2015).

Namun, dari hasil konsentrasi bromelin 5% selama waktu inkubasi yang berbeda juga menunjukkan adanya perbedaan nyata. Pada konsentrasi 10% hasil kadar asam glutamat dengan waktu inkubasi 1 dan 3 jam tidak menunjukkan beda nyata, sedangkan waktu inkubasi 5 jam menunjukkan perbedaan nyata dengan 1 dan 3 jam. Perbedaan tersebut dapat terjadi karena aktivitas enzim dipengaruhi oleh pH lingkungannya, sehingga apabila pH lingkungannya diluar dari pH optimalnya maka dapat menyebabkan penurunan aktivitas kerja enzim tersebut (Masri, 2014).

Kadar asam glutamat *Gracilaria* sp. pada penelitian ini diukur menggunakan “*Megazyme L-Glutamic Acid Kit*”. Prinsip dari *Megazyme kit* adalah NAD⁺ (*nicotinamide-adenine dinucleotide*) akan mengoksidasi *L-glutamic acid* dengan bantuan *glutamate dehydrogenase* (GIDH) sehingga menghasilkan 2 oksoglutarat yang akan mereduksi NADH dan ion amonium (NH⁴⁺). Reaksi tersebut akan dipercepat dengan bantuan *diaphorase*, sehingga NADH akan mereduksi idonitrotetrazolium chloride (INT) kedalam bentuk INT formazan. Jumlah INT formazan yang terbentuk akan mewakili jumlah *L-glutamic acid* dalam sampel dan diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang absorbansi 492 nm. Tetapi, pada penelitian sebelumnya yaitu Laohakunjit, *et al.* (2014) pengukuran asam amino dilakukan dengan menggunakan HPLC.

HPLC adalah alat yang digunakan untuk analisis protein, peptida dan asam amino. Prinsip dari penggunaan HPLC adalah pemisahan menggunakan kolom penukar ion (kation) resin polistiren yang tersulfonasi dalam bentuk Na⁺ (prinsipnya hampir sama dengan

metode *ion exchange*) (Sumarno *et al.*, 2002). Namun, HPLC tidak mengukur *L-glutamic acid* secara spesifik, sedangkan *Megazyme L-Glutamic Acid Kit* hanya mengukur bentuk bebas dari *L-glutamic acid*. Oleh sebab itu, hasil pengukuran asam glutamat dari Laohakunjit *et al.* (2014) lebih tinggi (46,7 mg/100 g protein) dari pada yang didapatkan dalam penelitian ini yaitu $2,97 \cdot 10^{-2}$ mg/g isolat protein. Perbedaan itu terjadi karena asam glutamat memiliki 2 isomer yaitu *D-glutamic acid* dan *L-glutamic acid*. Kedua isomer tersebut memiliki perbedaan letak amina (berkebalikan) pada rantainya dan rasa yang dihasilkan. *D-glutamic acid* memiliki rasa asin, sedikit manis dan *pungent*, sedangkan *L-glutamic acid* memiliki rasa *meaty*, sedikit pahit dan unik/ umami. Oleh sebab itu, kedua isomer tersebut tetap berperan dalam membentuk asam glutamat dan memberikan rasa (Schiffman & Karen, 1981). Namun, menurut Lindemann *et al.* (2002) serta Jinap & Hajeb (2010) yang berperan utama dalam memberikan rasa umami adalah bentuk bebas dari *L-glutamic acid* dan asam aspartat. Oleh karena itu, dalam penelitian ini digunakan *Megazyme L-Glutamic Acid Kit* untuk mengukur kadar asam glutamat *Gracilaria sp.* karena kit dari *Megazyme* spesifik hanya mengukur *L-glutamic acid* yang menghasilkan rasa umami (Lindemann *et al.*, 2002; Jinap & Hajeb 2010; Dewi *et al.*, 2016).

