

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Pengertian dan Fungsi Protein dalam Tubuh

Protein disebut juga zat gizi yang sangat penting, karena protein merupakan makromolekul yang berhubungan dengan proses- proses dalam tubuh. Kata protein diambil dari bahasa Yunani “*proteus*” (*Greek*) yang memiliki arti “yang terpenting” atau “yang pertama” (Suhardjo dan Clara, 1992). Protein juga merupakan senyawa organik yang memiliki jumlah dan ukuran molekul yang sangat besar, susunan protein juga terbilang kompleks, dan terdiri dari rangkaian asam amino. Ikatan pada satu asam amino dengan asam amino yang lain terjadi karena dihubungkan oleh ikatan peptida, sehingga protein seringkali disebut dengan polipeptida. Protein sendiri terdiri dari unsur-unsur hidrogen (H), karbon (C), nitrogen (N), dan oksigen (O) (Murray dkk, 2000).

Protein merupakan komponen penting dalam kehidupan suatu organisme terutama sebagai pendukung pertumbuhan dan perkembangan karena protein merupakan makromolekul penyusun tubuh atau penyusun sel yang sangat berperan dalam menentukan ukuran maupun struktur sel. Selain itu protein juga merupakan komponen terpenting dari sistem komunikasi antarsel dan juga sebagai katalisator segala reaksi biokimia dalam sel. Fungsi lain protein adalah protein juga berperan penting dalam perkembangan sel-sel otak, mengganti sel yang rusak dan memelihara sel. Protein juga dapat dikatabolis untuk menghasilkan energi (Khan dkk, 2010).

Protein mengandung unsur karbon sehingga menjadikan protein sebagai sumber energi. Protein akan dibakar untuk sumber energi apabila tubuh tidak mendapat karbohidrat dan lemak tidak dalam jumlah yang memadai untuk memenuhi kebutuhan tubuh (Suhardjo dan Clara, 1992).

Menurut Winarno (2004), seseorang yang kekurangan asupan protein akan rentan terkena berbagai macam gangguan di dalam tubuh, di antaranya:

1. Kwashiorkor

Kwashiorkor merupakan istilah yang digunakan untuk gejala yang sangat ekstrem, gejala ini diderita oleh anak-anak kecil dan bayi akibat kekurangan konsumsi protein, meskipun konsumsi energi atau kalori telah mencukupi kebutuhan.

2. Marasmus

Marasmus merupakan sebutan bagi gejala yang muncul apabila anak-anak menderita kekurangan gizi (kalori) dan juga kekurangan protein.

3. Busung Lapar

Busung lapar atau *hunger oedem* merupakan bentuk dari kurang gizi yang berat dan biasanya menimpa daerah kekurangan atau daerah yang miskin dan tandus serta timbul secara periodik pada masa paceklik, atau bisa juga disebabkan karena bencana alam seperti kemarau yang berkepanjangan, serangan hama tanaman serta banjir.

B. Pengertian dan Manfaat Protein Sel Tunggal

PST adalah produk biomassa tinggi protein dan berasal dari mikroorganisme. Mikroorganisme untuk menghasilkan PST biasanya dapat tumbuh dalam limbah yang memiliki unsur nitrogen dan karbon yang biasanya dijumpai dalam limbah industri. PST dapat dimanfaatkan sebagai cadangan atau pengganti protein dari sumber konvensional (hewani dan nabati) seperti hasil perikanan, peternakan, dan pertanian. Selain itu, PST dapat menghasilkan makanan yang sangat bergizi yang disebut sebagai *mycoprotein* (Nigam, 1998).

Menurut Tannemaum (1971), PST juga dapat dikatakan sebagai protein murni atau protein kasar dari mikrobial bersel tunggal atau banyak dan sederhana, seperti kapang, bakteri, khamir, protozoa dan alga. Terdapat dua istilah yang biasanya digunakan untuk produk mikroorganisme ini, yaitu *Single Cell Protein* atau Protein Sel Tunggal dan Produk Biomassa Mikrobial (PBM) atau *Microbial Biomass Product* (MBP) (Tannemaum 1971).

PST merupakan salah satu alternatif untuk pemenuhan kebutuhan protein di masa depan karena mempunyai komposisi kandungan asam amino esensial yang dibutuhkan manusia dan hewan (Kuswardani dan Wijajaseputra, 1998). Kelebihan PST adalah bernilai gizi tinggi sebab mempunyai kadar protein, vitamin, dan lemak yang cukup tinggi serta memiliki kandungan asam amino yang lengkap. Keuntungan PST dibandingkan dengan produk protein lainnya adalah produktivitas yang tinggi, proses pembuatannya relatif cepat, serta substrat yang

digunakan untuk fermentasi mudah didapatkan (Kuswardani dan Wijajaseputra, 1998).

Terdapat beberapa limbah dari buah- buahan yang digunakan sebagai media *Saccharomyces cerevisiae* untuk produksi PST, hasil yang diperoleh adalah terjadi peningkatan protein sebesar 26,26 % pada limbah jeruk manis, 54,28 % (limbah delima), 39,98 % (limbah mangga), 50,86 % (limbah apel), 58,62 %, dan (limbah pisang) selama 24 jam (Mahnaaz dkk., 2010).

C. Buah Naga Merah (*Hylocereus polyrhizus*)

Tanaman buah naga merupakan tanaman di daerah tropis dan memiliki sifat mudah beradaptasi pada macam kondisi lingkungan tumbuh dan terhadap perubahan cuaca diantaranya angin, curah hujan, dan sinar matahari. Jumlah atau banyak sinar matahari yang dibutuhkan adalah sekitar 70 hingga 80 %. Maka dari itu tanaman ini lebih baik ditanam pada lahan yang tidak memiliki naungan. Sementara curah hujan yang dibutuhkan untuk pertumbuhan dan perkembangan tanaman buah naga adalah 720 mm/tahun. Pertumbuhan dan perkembangan tanaman buah naga ini akan lebih optimum apabila ditanam di daerah dataran rendah dengan ketinggian antara 0 –350 mdpl. Suhu lingkungan yang optimum bagi tanaman ini antara 26-36° C serta kelembaban 70 hingga 90 %. Sementara derajat keasaman (pH) tanah yang optimum untuk pertumbuhannya bersifat sedikit alkalis yaitu 6,5–7 (Hardjadinata, 2010).

Menurut Syukur dan Muda (2015), buah naga terbagi menjadi empat jenis, yaitu:

- a. Buah naga putih (*Hylocereus undatus*), yang memiliki ciri buah berwarna merah dengan daging buah putih. Memiliki batang yang berwarna kehijauan, tanaman lebih tinggi dan permukaan batang lebih kasar dibandingkan dengan varitas buah naga merah, harga lebih rendah dan memiliki rasa yang kurang manis jika dibandingkan dengan buah naga berdaging merah.
- b. Buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*), mempunyai ciri-ciri kulit buah yang berwarna kemerahan dengan daging berwarna buah merah. Buah naga jenis ini paling banyak diminati banyak ditanam di Indonesia. Selain karena rasanya lebih manis dan air yang lebih banyak, dari segi budidayanya juga tidak terlalu sulit bila dibandingkan dengan jenis-jenis lainnya.
- c. Buah naga kuning (*Selenicereus megalanthus*), yang memiliki ciri-ciri kulit buah yang kuning dan memiliki daging buah berwarna putih. Buah dan isinya pada umumnya berukuran lebih kecil sehingga kurang bagus dijadikan komoditi perdagangan.
- d. Buah naga super merah (*Hylocereus costaricensis*), yang memiliki warna daging super merah. Dari berbagai jenis di atas hanya dua varitas yang banyak dibudidayakan di Indonesia yaitu varitas merah

dan varitas putih. Varitas ini mempunyai sifat tanaman yang berbeda dengan buah naga merah dan putih.

Secara morfologi, tanaman buah naga adalah tanaman yang tidak lengkap dikarenakan tidak memiliki daun. Agar dapat beradaptasi dengan lingkungan kering, tanaman buah naga memiliki duri di seluruh cabang dan batangnya. Tanaman buah naga juga merupakan tanaman merambat/ memanjat dan bersifat epifit. Di habitat asli, tanaman ini merambat pada tanaman lain untuk dapat tumbuh. Walaupun akar tanaman di dalam tanah dicabut, tanaman ini tetap dapat bertahan hidup dikarenakan memiliki akar yang tumbuh di bagian batang. Akar di batang tersebut mampu menyerap cadangan makanan dari udara (Emil, 2011).

Buah naga memiliki perakaran yang bersifat epifit, menempel atau merambat pada tanaman lain. Akarnya berupa akar serabut yang terdapat pada pangkal batang yang tumbuh pada media tanah maupun yang menempel pada media rambatan berupa tiang atau kayu (Emil, 2011). Tanaman buah naga memiliki akar yang tahan dengan lingkungan kering dan sulit hidup jika terendam air yang cukup lama. Akar tanaman tidak terlalu panjang dan terbentuk akar cabang. Tumbuh akar rambut yang sangat lembut, banyak, dan kecil dari akar cabang (Kristanto, 2003). Perakaran buah naga biasanya dangkal yang berkisar 20 hingga 30 cm, tetapi menjelang masa produksi buah, tanaman ini memanjangkan akarnya hingga mencapai kedalaman 50 hingga 60 cm, dan mengikuti panjang dari batang berwarna coklat yang tertanam di dalam tanah (Hardjadinata, 2012).

Tanaman buah naga memiliki penampang melintang batang yang berbentuk segitiga, akan memanjang hingga dapat mencapai panjang maksimum sekitar 9 meter dan memiliki warna hijau hingga hijau tua. Tanaman buah naga memiliki batang dengan duri-duri untuk beradaptasi dengan lingkungan. Bagian batang tanaman buah ini berlapis lilin dan mampu memanjat pada tembok atau tiang penopang (Yanti, 2008). Batang tanaman buah naga berlapis lilin apabila sudah dewasa dan mengandung air dalam bentuk lendir. Batangnya berbentuk segitiga dengan warna hijau. Cabang dan batang yang tumbuh tersebut berperan sebagai daun pada proses asimilasi. Cabang dan batang ditumbuhi duri- duri yang keras tetapi sangat kecil dan tidak terlihat mencolok. Letak duri tersebut ada pada tepi cabang maupun batang (Setyowati, 2008).

Menurut Hardjadinata (2010), buah naga juga masuk dalam famili Cactaceae atau kelompok kaktus. Klasifikasi buah naga merah tersebut adalah:

Divisi	: Spermatohyta
Anak divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
Bangsa	: Cactales
Suku	: Cactaceae
Marga	: <i>Hylocereus</i>
Jenis	: <i>Hylocereus polyrhizus</i>

Buah naga atau buah pitaya memiliki bentuk bulat lonjong dan agak memanjang menyerupai nanas dan memiliki jumbai serta kulitnya berwarna merah muda dihiasi sisik seperti naga (Cahyono, 2009). Batang tanaman memiliki duri pendek yang tidak tajam. Berat buah berkisar antara 80 – 500 gram. Berdasarkan

jenisnya, kulit buah naga ada yang berwarna kuning, merah gelap, dan merah menyala (Cahyono, 2009). Kulit buahnya tebal sekitar 3 – 4 mm. Kulitnya dihiasi dengan jumbai yang menyerupai sisik. Daging buah memiliki serat yang halus dan di dalam daging buah terdapat biji hitam yang sangat banyak serta berukuran kecil. Daging buah memiliki tekstur yang lunak dan rasanya manis serta sedikit masam (Cahyono, 2009).

Buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) yang banyak dibudidayakan di Australia dan Cina ini memiliki kulit buah dengan dihiasi sisik atau jumbai dan berwarna merah serta daging berwarna merah keunguan, berat buah sekitar 400 gram (Gambar 1). Rasa buah lebih manis dibanding buah naga berdaging putih (*Hylocereus undatus*), dengan kadar kemanisan sekitar 13-15 % Briks (Kristanto, 2008).



Gambar 1. Buah Naga Merah (Sumber: Kristanto, 2008)
Keterangan : Kulitnya terdapat sisik atau jumbai hijau, dan memiliki berat buah sekitar 400 gram.

Menurut Saneto (2012), kulit buah naga merah mengandung karbohidrat sebesar 72,1 % (Tabel 1). Karbon yang terdapat dalam karbohidrat terutama glukosa adalah sumber utama dalam metabolisme penghasil pada energi sel

(Murray dkk, 2003) dan dapat dimanfaatkan sebagai penyusun molekul organik yang meliputi protein, karbohidrat, lipid, nukleotida dan asam amino. Molekul organik berfungsi untuk menyediakan energi untuk mempertahankan fungsi sel atau tubuh. Glukosa mengalami metabolisme dan memungkinkan sel bergerak, berkembangbiak atau memperbanyak diri (Murray, 2003). Selain itu, mikroorganisme penghasil PST umumnya tumbuh pada limbah yang mengandung nitrogen dan karbon (Nigam, 1998).

Tabel 1. Komposisi Proksimat Beberapa Buah dan Sayur (%)

Sumber	Protein	Lemak	Abu	Karbohidrat
Kulit buah naga merah	3,2	0,7	19,3	72,1
Apel	5,1	2,5	1,6	82,2
Pir	2,7	1,0	1,4	88,0
Jeruk	7,9	0,5	2,9	82,4
Pic	7,1	1,5	2,9	83,5
Artichoke	15,6	1,0	7,5	71,1
Asparagus	16,2	2,0	5,3	70,3
Tomat	24,9	3,2	5,1	19,3

Sumber: Saneto, 2012

Buah naga merupakan tumbuhan yang memiliki kandungan antioksidan yang tinggi. Senyawa antioksidan dapat diperoleh di bagian tumbuhan seperti akar, daun, batang, kulit, dan daging. Buah naga memiliki kandungan kimia flavonoid, fenolik, polifenol (Jaafar dkk, 2009). Menurut penelitian Li Chen Wu (2005), kulit buah naga merah adalah sumber antioksidan dan *polyphenol*. Nurliyana (2010), menambahkan bahwa aktivitas antioksidan pada kulit buah naga merah lebih besar daripada aktivitas daging buahnya.

D. Ciri Morfologi dan Karakteristik *Saccharomyces cerevisiae*

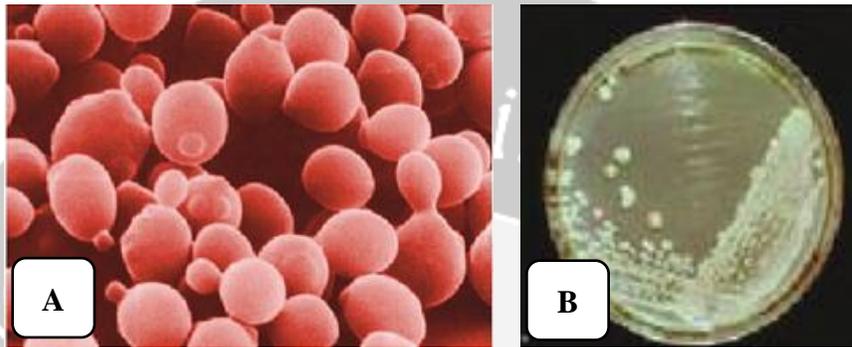
Saccharomyces cerevisiae masuk dalam golongan genus *Saccharomyces* yang memiliki bentuk oval atau memanjang. *Saccharomyces cerevisiae* memiliki panjang sel sekitar 1-50 μm dan lebar sekitar 1-10 μm (Volk dan Wheeler, 1988). Khamir masuk dalam golongan fungi dan bersifat uniseluler serta hidup berkoloni (Fardiaz, 1992). Genus *Saccharomyces* memiliki ciri sel oval dan berbentuk bulat, atau juga silindris, memiliki pertunasan multilateral, memiliki askospora bulat - oval pendek biasanya berjumlah 1-4 per askus, askus kuat dan tidak mudah pecah, serta dapat membentuk *pseudohifa* namun tidak membentuk septa (Gambar 2) (Kreger-van Rij, 1984). Pada media cair tidak membentuk pelikel atau cincin serta mampu melakukan fermentasi dengan cepat. *Saccharomyces* mampu melakukan fermentasi dengan cepat pada gula glukosa dan sukrosa yang hasilnya sudah terlihat pada hari kedua setelah inokulasi (Widiastutik dan Alami, 2014). Viljoen (2001) menyatakan bahwa khamir juga mampu memfermentasi laktosa.

Morfologi makroskopik menunjukkan *Saccharomyces cerevisiae* memiliki koloni yang berwarna putih, kecoklatan, krem atau abu-abu, berbentuk bulat, permukaan koloni berkilau sampai kusam, dengan tekstur yang lunak, serta licin (Ahmad, 2008). Menurut Wigyanto dkk, (2001), fermentasi *Saccharomyces* sp menghasilkan metabolit primer berupa etanol dan metabolit sekunder yang berupa asam laktat. Pada fermentasi menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* akan terjadi penurunan pH. Fermentasi yang menghasilkan etanol dan CO_2 juga hasil metabolisme dari *Saccharomyces cerevisiae* menyebabkan semakin turunnya nilai

pH produk. Molekul air (H_2O) akan bereaksi dengan gas CO_2 yang terbentuk dan akan membentuk H_2CO_3 sebagai reaksi karbonasi yang dapat diketahui dengan terbentuknya gelembung gas dan akan terlepas apabila tekanan dalam wadah lebih rendah dari tekanan atmosfer. H_2CO_3 memberikan suasana asam pada produk akhir sehingga produk akan memiliki pH yang rendah (Hawusuwa dkk, 2015). Selain itu penurunan nilai pH juga disebabkan karena adanya asam- asam organik yang merupakan metabolit sekunder hasil fermentasi. Asam-asam organik seperti asam piruvat dan asam asetat yang terbentuk selama proses fermentasi juga berpengaruh pada derajat keasaman (pH). Oksigen juga akan menghasilkan asam laktat dari reaksi oksidasi etanol sehingga pH medium akan menurun (Hawusuwa dkk, 2015).

Pengamatan spora khamir dilakukan menggunakan metode pewarnaan tahan asam atau Ziehl Neelsen (ZN). Pengecatan ini bertujuan untuk melihat daya tahan mikroorganisme terhadap keadaan lingkungan sekitar yang kurang mendukung dengan cara membentuk spora. Pewarnaan ini menggunakan pewarna utama (ZN A) yaitu karbol fuksin yang berwarna merah. Spora khamir yang berada di dalam askus akan tampak sedikit berwarna kemerahan. Hal ini terjadi karena spora *Saccharomyces cerevisiae* terdapat dalam askus yang kuat dan tahan dari berbagai cekaman lingkungan seperti asam dan kekeringan (Purves dan Sadava, 2003). Sifat askus ini membuat *Saccharomyces cerevisiae* dapat diawetkan dalam bentuk ragi. *Saccharomyces cerevisiae* mempunyai 2 macam cara perkembangbiakan, yaitu secara seksual dan aseksual. Cara seksual yaitu dengan fusi (penggabungan) dua sel dengan *mating type* yang berbeda. *Saccharomyces cerevisiae* memiliki mating

type α dan α , sedangkan cara aseksual yaitu dengan bertunas (Purves dan Sadava, 2003).



Gambar 2. *Saccharomyces cerevisiae*. A. Sel *Saccharomyces cerevisiae* ; B. Biakan *Saccharomyces cerevisiae* (Sumber: Achmad dkk, 2011).

Keterangan : A. panjang sel sekitar 1-50 μm dan lebar sekitar 1-10 μm , memiliki bentuk oval atau memanjang; B. Khamir hidup membentuk koloni.

Pengamatan bentuk sel *Saccharomyces cerevisiae* dan viabilitas sel menggunakan pengecatan *methylene blue*. Cat *methylene blue* termasuk jenis cat basa kationik dan bermuatan positif yang akan memberikan warna biru pada sel yang sudah mati dan transparan pada sel yang masih hidup (Benson, 2002). Warna transparan pada sel yang masih hidup disebabkan karena adanya membran selektif permeabel pada dinding sel mikroorganisme sehingga tidak semua zat mudah berdifusi ke dalam sel. Berbeda pada sel yang telah mati, membran selektif permeabel pada dinding sel mikrobial akan luruh sehingga cat *methylene blue* akan masuk ke dalam sel dan menyebabkan sel berwarna biru (Soetarto, 2008).

Mikroorganisme yang sering digunakan adalah *yeast*. *Yeast* dapat tumbuh pada bahan yang mengandung gula, Pemilihan *yeast* dalam produksi Protein Sel Tunggal (PST) dilakukan karena kemudahan pemeliharaan kultur, kesederhanaan medis, laju pertumbuhan, dan kandungan protein serta kualitas gizinya. Hal ini dimaksudkan karena PST digunakan sebagai sumber protein disamping berperan sebagai sumber vitamin B dan mineral (Muljono, 1990). *Yeast* mengandung protein kasar berkisar antara 55–60 % dan asam nukleat berkisar 15 % pada basis kering. Berbeda dengan fungi dengan kandungan protein kasarnya 50-55 % dan algae kandungan protein kasarnya 60 % (Pawignya, 2011).

Khamir seperti pula mikroorganisme yang lain memerlukan medium dan lingkungan yang optimum untuk pertumbuhan dan perkembangbiakannya. Beberapa unsur merupakan dasar kehidupan, seperti oksigen, hidrogen, karbon, fosfor, potassium, magnesium, dan zat besi. Unsur karbon terutama diperoleh dari gula, sebagai sumber unsur nitrogen dapat digunakan garam, amonia, peptida, amonium, nitrat, urea dan senyawa-senyawa ini tergantung pada jenis khamir. Fosfor merupakan unsur penting dalam pertumbuhan khamir, terutama dalam pembentukan alkohol dari gula, contohnya dalam pembentukan heksosa dan triosa fosfat (Prescott dan Dunn, 1981).

Menurut Pawignya (2011), jenis *yeast* yang dapat digunakan untuk pembuatan Protein Sel Tunggal antara lain:

a. *Saccharomyces cereviceae*

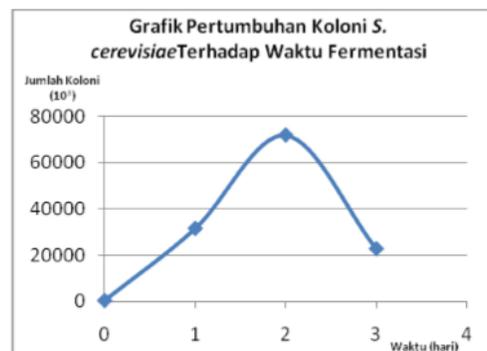
b. *Candida utilis*.

c. *Kluyveromyces lactis*.

d. *Kluyveromyces marxianus*.

Menurut Wulandari dkk (2012), pertumbuhan biomassa untuk produksi PST dihasilkan oleh *Endomycopsis fibuligera* dengan biomassa tertinggi 101,46 mg dalam waktu 30 jam, *Candida utilis* dengan biomassa tertinggi 102,5 mg dalam waktu 30 jam, dan *Saccharomyces cerevisiae* dengan biomassa tertinggi 156,33 mg dalam waktu 18 jam, sehingga dapat disimpulkan bahwa *Saccharomyces cerevisiae* merupakan khamir yang terbaik untuk pertumbuhan biomassa dalam PST (Wulandari dkk, 2012).

Keuntungan *yeast* pada penelitian yang menggunakan *Saccharomyces cereviceae*, ini adalah *Saccharomyces cereviceae* dapat beradaptasi terhadap lingkungan yang asam dengan pH antara 3,5 sampai 5,5 serta memiliki suhu pertumbuhan 25–30 °C (Pawignya, 2011). Keuntungan lain *yeast* ini mudah dipisahkan secara sentrifugal, tanpa membutuhkan tahap penggumpalan yang dikarenakan *yeast* mempunyai diameter sel yang besar sekitar 0,0005 cm. (Marx, 1991).



Gambar 3. Grafik Pertumbuhan Koloni *Saccharomyces cerevisiae* Terhadap Waktu Fermentasi (Sumber: Wahono dkk, 2011).

Menurut Wahono dkk (2011), *Saccaromyces cerevisiae* memiliki kecepatan pertumbuhan yang relatif rendah pada jam ke-0 sampai ke-24. Hal ini disebabkan karena *Saccaromyces cerevisiae* masih berada dalam fase lag (fase adaptasi) dan sel masih beradaptasi dengan kondisi lingkungannya. Pada fase ini *Saccaromyces cerevisiae* mengubah substrat menjadi nutrisi untuk pertumbuhannya. Jam berikutnya saat memasuki jam ke-24 sampai jam ke-48 terlihat adanya penambahan sel mikrobial yang signifikan. Hal ini menandakan bahwa *Saccharomyces cerevisiae* telah memasuki fase pertumbuhan eksponensial (fase log) (Gambar 3). Kavanagh (2005) menyebutkan bahwa pada fase ini *Saccharomyces cerevisiae* bereproduksi dengan cara membentuk tunas, kemudian jam ke-48, sel khamir memasuki fase kematian.

Sel khamir dapat diamati dengan melakukan pengecatan sederhana. Pewarnaan sederhana yaitu pewarnaan dengan menggunakan suatu macam zat warna yang bertujuan untuk melihat bentuk sel dan ciri lain sel khamir serta untuk mengetahui morfologi dan susunan selnya serta membedakan sel yang mati dan yang hidup dengan cara pemberian warna pada khamir dengan menggunakan larutan tunggal suatu warna pada lapisan tipis atau olesan yang sudah difiksasi. (Balley, 2007).

Identifikasi *Saccharomyces cerevisiae* dilakukan juga dengan fermentasi gula atau fermentasi karbohidrat yang bertujuan untuk mendeteksi kemampuan mikroorganisme untuk memfermentasi gula tertentu. Selama proses fermentasi, substrat organik berperan sebagai aseptor elektron akhir. Produk akhir fermentasi

gula adalah asam atau asam dengan gas (Forbes, 2007). Reaksi fermentasi dapat dilihat dari warna awal merah berubah menjadi warna kuning.

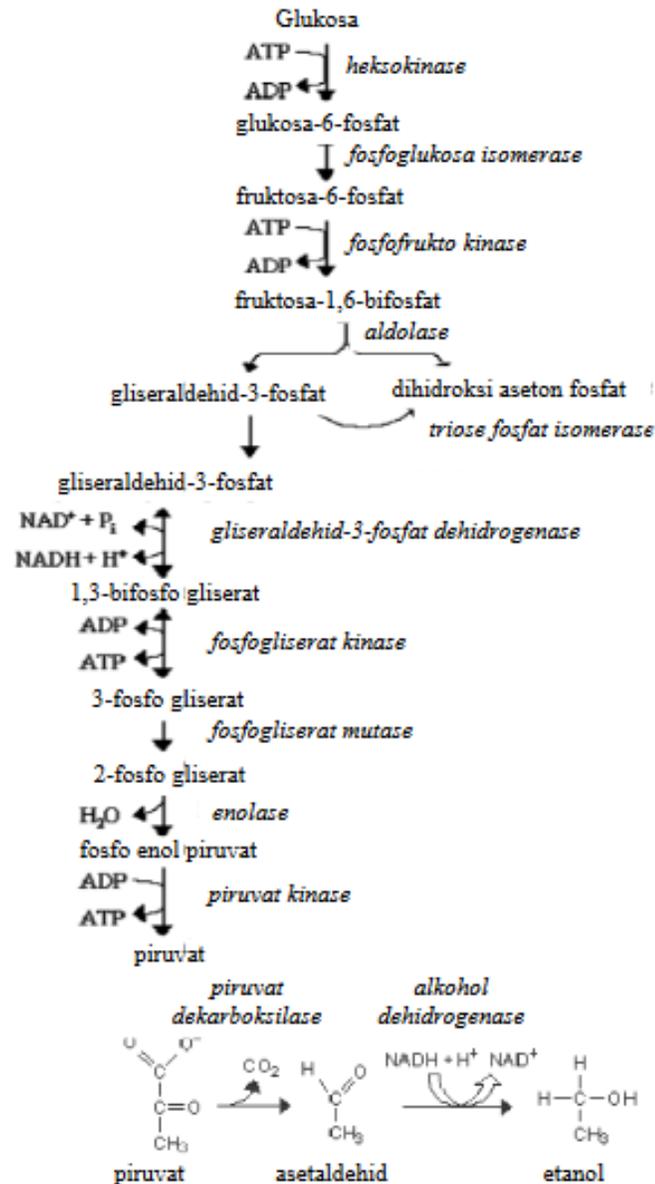
E. Pengertian dan Hasil Fermentasi

Fermentasi adalah proses katabolisme atau perombakan senyawa organik dalam kondisi anaerob menghasilkan produk berupa asam-asam organik, alkohol dan gas (Brock dan Madigan, 1991). Fermentasi juga dikatakan sebagai suatu proses perubahan kimia pada bahan baku organik, baik lemak, protein, karbohidrat atau lainnya, melalui proses biokatalis dan diketahui sebagai enzim yang diproduksi oleh jenis mikroorganisme spesifik (Prescott dan Dunn, 1981). Fermentasi anaerob adalah fermentasi yang tidak memerlukan O_2 , sedangkan fermentasi aerob merupakan fermentasi yang membutuhkan O_2 (Wanto dan Soebagyo, 1980).

Senyawa metabolit primer adalah senyawa yang dihasilkan oleh makhluk hidup yang bersifat esensial pada proses metabolisme sel dan keseluruhan proses sintesis dan perombakan zat-zat ini yang dilakukan oleh organisme untuk kelangsungan hidupnya (Almatsier, 2009).

Beberapa unsur dasar yang dibutuhkan oleh khamir yaitu karbon, oksigen, hidrogen, zat besi, fosfor, dan magnesium. Unsur karbon dapat diperoleh dari gula, sedangkan sumber nitrogen diperoleh dari amonia, peptida, pepton nitrat, asam amino, atau urea tergantung pada jenis khamir. Fosfor juga

merupakan unsur penting dalam pertumbuhan khamir terutama untuk pembentukan alkohol (etanol) dari gula.

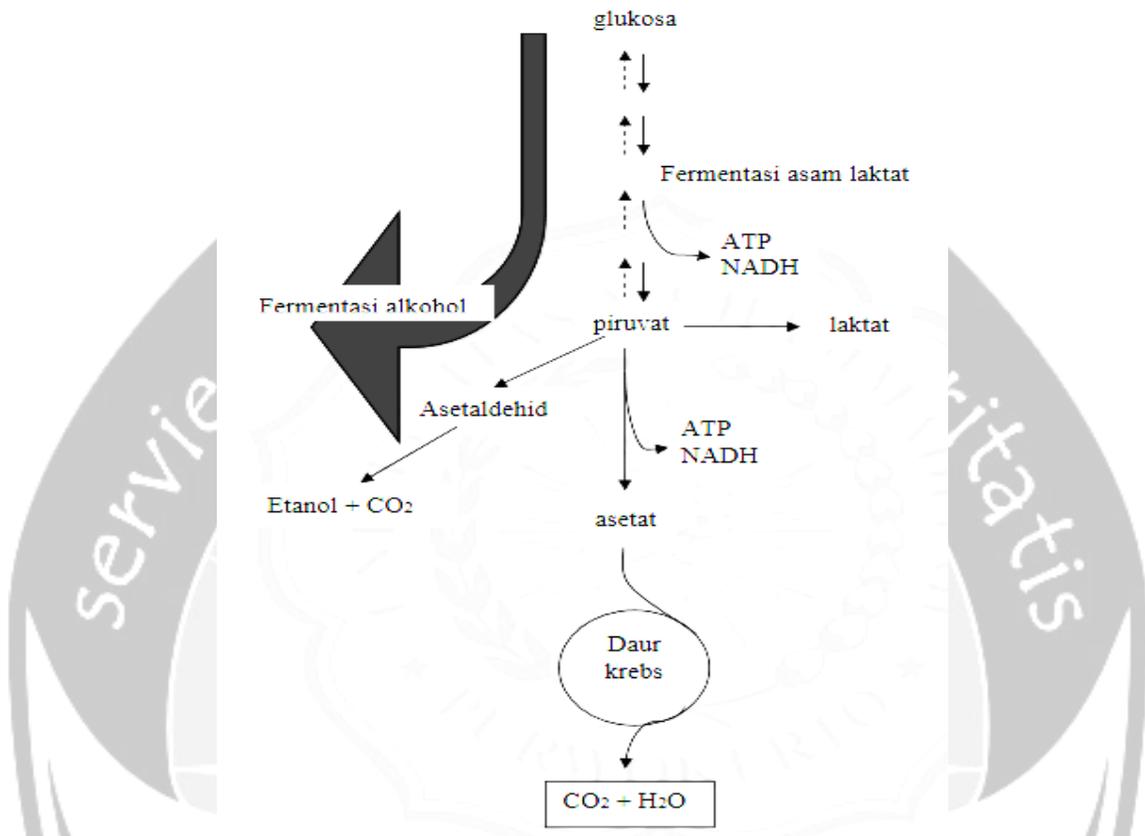


Gambar 4. Jalur Pembentukan Etanol *Embden Meyerhoff-Parnas Pathway* (Sumber: Diwan, 2007).

Metabolisme glukosa menjadi etanol pada kondisi anaerob terjadi melalui jalur *Embden Meyerhoff-Parnas* (Gambar 4). Reaksi-reaksi fosforilasi dan

defosforilasi dengan ATP dan ADP sebagai donor aseptor fosfat, reaksi pemecahan C6 menjadi 2 molekul C3 yang terfosforilasi, reaksi reduksi- oksidasi dan reaksi dekarboksilasi. Gukosa mengalami fosforilasi menjadi glukosa-6-P dan fruktosa-6-P dengan ATP sebagai donor fosfat. Fruktosa-6-P kemudian dirubah menjadi fruktosa 1.6-di-P kemudian dipecah menjadi 2 molekul C3 yang terfosforilasi yaitu dihidroksiaseton fosfat dan gliseraldehida-3-P. Dihidroksi aseton fosfat kemudian teroksidasi menjadi gliserol fosfat dan diubah menjadi metabolit sekunder yang berupa gliserol. Asam 1.3-difosfogliserat terbentuk dari reduksi Gliseraldehid-3-P kemudian mengalami difosforilasi menjadi 3-P-asam gliserat dengan melepaskan fosfat dan akseptor fosfat ADP membentuk ATP. Selanjutnya, 3-P asam gliserat membentuk 2-P asam gliserat dan kemudian terbentuk asam fosfoenol piruvat dengan menghasilkan ATP. Melalui reaksi triose fosfat isomerase dekarboksilasi, asam piruvat akan terbentuk asetaldehid dan CO₂ yang kemudian akan mengalami reaksi oksidasi dan membentuk etanol

Penurunan pH dapat digunakan sebagai indikator bahwa proses fermentasi berjalan dengan baik. pH yang rendah merupakan indikasi banyaknya asam organik yang terbentuk akibat adanya aktifitas khamir (Fardiaz, 1992). Pembentukan asam piruvat, asam asetat, dan asam laktat selama proses fermentasi berlangsung juga akan menyebabkan penurunan pH (Gambar 5).



Gambar 5. Metabolisme Karbohidrat – Fermentasi Alkohol (Sumber: Wirahadiakusuma, 1985).

Jalur metabolisme proses ini sama dengan glikolisis sampai dengan terbentuknya piruvat menjadi asetaldehid, dan reaksi di reduksi asetaldehid menjadi alkohol. Pada reaksi pertama piruvat didekarboksilasi diubah menjadi asetaldehid dan CO₂ oleh piruvat dekarboksilase, suatu enzim yang tidak terdapat dalam hewan. Reaksi dekarboksilasi ini merupakan reaksi yang ireversibel, membutuhkan ion Mg²⁺ dan koenzim tiamin pirofosfat. Reaksi berlangsung melalui beberapa senyawa antara yang terkait secara kovalen pada koenzim. Dalam reaksi yang terakhir, asetaldehid direduksi oleh NADH dengan enzim alkohol dehidrogenase, menghasilkan etanol.

Dengan demikian maka etanol dan CO₂ merupakan hasil akhir fermentasi alkohol dan jumlah energi yang dihasilkan sama dengan glikolisis anaerob, yaitu 2 ATP per molekul glukosa (Wirahadikusumah, 1985).

F. Metode Pengukuran Protein dengan Lowry

Analisis protein dibagi menjadi dua metode, yaitu analisis secara kualitatif dan secara kuantitatif. Analisis protein secara kualitatif terdiri atas, reaksi Hopkins-Cole, reaksi Xantoprotein, reaksi Nitroprusida, reaksi Sakaguchi, dan reaksi Millon, sedangkan secara kuantitatif terdiri dari metode Kjeldahl, metode Lowry, metode spektrofotometri visible (Biuret), metode spektrofotometri UV, dan metode titrasi formol (Poedjiadi, 2007).

Pengukuran kadar protein merupakan salah satu cara pengukuran massa sel secara tidak langsung yang didasarkan atas pengukuran komponen sel berupa protein. Kadar protein dinyatakan dalam bentuk persen dan diukur menggunakan metode Lowry dengan *Bovine Serum Albumine* (BSA) sebagai standart (Purwitasari dkk, 2004). Metode Lowry merupakan uji protein kuantitatif secara modern, yaitu dengan spektrofotometer *visible*. Metode ini digunakan untuk menguji kadar protein terlarut atau protein yang dapat diserap oleh tubuh (Soeharsono, 2006). Metode Lowry merupakan kombinasi antara pereaksi biuret dengan pereaksi *Folin-Ciocalteau phenol* yang akan bereaksi dengan residu *tryptophan* dan *tyrosine* dalam protein. Reaksi ini akan menghasilkan warna biru yang dapat dibaca di antara 500-750 nm, tergantung dari sensitivitas yang

dibutuhkan. Puncak kecil akan muncul sekitar 500 nm dan dapat digunakan untuk menentukan protein dengan konsentrasi tinggi dan sebuah puncak besar disekitar 750 nm yang dapat digunakan untuk menentukan kadar protein dengan konsentrasi rendah (Soeharsono, 2006).

Penentuan konsentrasi protein oleh Lowry (1951) menggunakan reagen pendeteksi gugus-gugus fenolik seperti reagen folin dan *ciocalteu* yang kemudian dikenal dengan metode Lowry. *Folin ciocalteu* dapat mendeteksi residu tirosin (dalam protein) karena kandungan fenolik dalam residu tersebut mampu mereduksi fosfomolibdat dan fosfotungstat yang merupakan konstituen utama reagen *folin ciocalteu*, menjadi tungsten dan molibdenum yang berwarna biru. Hasil reduksi ini menunjukkan puncak absorpsi yang lebar pada daerah merah. Sensitivitas dari metode *folin ciocalteu* ini mengalami perbaikan yang cukup signifikan apabila digabung dengan ion-ion Cu (Hermansyah, 2012).

Biasanya digunakan serum albumin sebagai standar penentuan kadar protein untuk memperoleh garis regresi hubungan antara absorbansi dengan konsentrasi protein. Ada 2 macam reagen Lowry yaitu larutan A yang terdiri dari fosfotungstat-fosfomolibdat (1:1) dan larutan Lowry B yang terdiri dari Na-carbonat 2 % dalam NaOH 0,1 N, kupri sulfat dan Na-K-tartat 2 % (Hermansyah, 2012).

Metode Lowry merupakan pengembangan dari metode Biuret. Dalam metode ini terjadi 2 reaksi. Awalnya, kompleks Cu(II)-protein akan terbentuk sebagaimana metode biuret, yang dalam suasana alkalis Cu(II) akan tereduksi

menjadi Cu(I). Ion Cu⁺ kemudian akan mereduksi reagen *Folin-Ciocalteu*, kompleks *phosphomolibdat phosphotungstat (phosphomolybdotungstate)*, menghasilkan *heteropoly molybdenum blue* akibat reaksi oksidasi gugus aromatik (rantai samping asam amino) terkatalis Cu, yang memberikan warna biru intensif yang dapat dideteksi secara kolorimetri (Sudarmadji, 1996).

Spektrofotometer digunakan untuk mengukur jumlah penyerapan zat suatu senyawa. Dalam spektrofotometri penyerapan cahaya pada senyawa larutan dapat digunakan sebagai dasar dalam penentuan konsentrasi larutan atau senyawa secara kuantitatif (Sudarmadji, 1996).

G. Substrat Mikrobia

Bahan yang digunakan untuk pertumbuhan mikroorganisme di laboratorium disebut media kultur. Pengetahuan tentang habitat normal mikroorganisme sangat membantu dalam pemilihan media yang cocok untuk pertumbuhan mikroorganisme di laboratorium. Berdasarkan konsistensi, media dikelompokkan menjadi dua macam yaitu media padat (*solid media*) dan media cair (*liquid media*) dan (Sylvia, 2008).

Substrat juga sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan dan perkembangan mikrobia. Substrat yang digunakan untuk proses fermentasi berpengaruh terhadap produktivitas dan aktivitas enzim. Proses fermentasi terjadi karena adanya aktivitas mikroba dengan substrat organik yang sesuai. Kecepatan pertumbuhan mikrobia tergantung pada konsentrasi substrat (Khairil, 2008).

Substrat tersebut harus mampu dirombak oleh mikrobia dari bahan mentah yang berupa beberapa komponen pada medium atau substrat, serta mengubah bahan mentah tersebut menjadi bahan baru (Judoamidjojo, 1992).

Kebutuhan elemen dasar mikroba yang digunakan yaitu sumber C yang diperoleh dari karbohidrat. Dan untuk zat tambahan dalam medium fermentasi digunakan sumber nitrogen dan mineral. Sumber nitrogen yang digunakan akan mempengaruhi proses fermentasi. Salah satu contoh formulasi mineral dan nitrogen tersebut adalah amonium sulfat.

H. Hipotesis

1. pH optimum *Saccharomyces cerevisiae* untuk produksi Protein Sel Tunggal adalah 5
2. Waktu inkubasi *Saccharomyces cerevisiae* yang tepat dengan peningkatan kadar protein yang paling signifikan adalah pada jam ke-48.