# BIOPROSES LIMBAH UDANG WINDU MELALUI TAHAPAN DEPROTEINASI DAN DEMINERALISASI TERHADAP PROTEIN DAN MINERAL TERLARUT

# MAKALAH ILMIAH

Oleh:

Abun



JURUSAN NUTRISI DAN MAKANAN TERNAK
FAKULTAS PETERNAKAN
UNIVERSITAS PADJADJARAN
JATINANGOR 2006

# **KATA PENGANTAR**

### Assalamu'alaikum, wr.wb.

Puji syukur penulis panjatkan ke Hadirat Allah Swt, karena atas Rahmat-Nya makalah ini dapat diselesaikan. Judul makalah ini adalah 'Bioproses Limbah Udang Windu melalui Tahapan Deproteinasi dan Demineralisasi terhadap Protein dan Mineral Terlarut''.

Makalah ini dibuat sebagai salah satu landasan ilmiah dalam bidang bioteknologi pakan serta sebagai pedoman dalam Mata Kuliah Teknologi Pakan', dimana didalamnya membahas tentang teknologi fermentasi nelalui bioproses dengan menggunakan jasa mikroba dalam rangka penyediaan pakan alternatif.

Pada kesempatan ini, penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

- Dekan Fakultas Peternakan Universitas Padjadjaran, yang telah memberikan kepercayaan untuk melakukan penulisan makalah ilmiah ini.
- Kepala Laboratorium Nutrisi Ternak Unggas Non Ruminansia dan Industri Makanan Ternak, Fakultas Petemakan Universitas Padjadjaran, Jatinangor, yang telah memberikan pasilitas dan bimbingannya dalam penulisannya.
- 3. Semua pihak yang telah membantu terlaksananya makalah ini.

Akhirnya penulis berharap makalah ini bermanfaat bagi berbagai pihak yang memerlukannya.

Jatinangor, Ferbruari 2006

Penulis,

# **DAFTAR ISI**

BAB		Halaman
	KATA PENGANTAR	i
	DAFTAR ISI	ii
	DAFTAR TABEL	iv
I	PENDAHULUAN	1
	1.1. Latar Belakang	1
	1.2. Identifikasi Masalah	3
	1.3. Maksud dan Tujuan	3
	1.4. Kegunaan Penelitian	3
II.	KEPUSTAKAAN	4
	2.1. Udang Windu	4
	<ul><li>2.2.1. Limbah udang dan Pemanfaatannya sebagai Pakan Ternak</li><li>2.1.2. Kitin</li></ul>	5 6
	2.2. Fermentasi	7
	2.2.1. Arti dan manfaat Fermentasi	7
	2.2.2. Jenis Fermentasi	8 8
	2.3. Deproteinasi oleh <i>Bacillus licheniformis</i>	8
	2.4. Demineralisasi oleh <i>Aspergillus niger</i>	12
	2.5. Protein dan Mineral	13
III.	METODE PENELITIAN	14
	3.1. Bahan Penelitian	14
	3.2. Alat Penelitian	14
	3.3. Prosedur Penelitian	15
	3.4. Parameter yang Diamati	17

	3.5. Analisis Statistik dan rancanga percobaan	18	
IV.	HASIL DAN PEMBAHASAN	19	
	4.1. Pengaruh Perlakuan terhadap Kandungan Protein Terlarut	19	
	4.2. Pengaruh Perlakuan terhadap Kandungan kalsium Terlarut	23	
	4.3. Pengaruh Perlakuan terhadap Kandungan FosforTerlarut	26	
V.	KESIMPULAN DAN SARAN	31	
	5.1. Kesimpulan	31	
	5.2. Saran	31	
	DAFTAR PUSTAKA	32	

# DAFTAR TABEL

Nome	or	Halaman
1.	Rataan Kandungan Protein Terlarut dari Masing-masing Perlakuan	19
2.	Uji Tukey Pengaruh Dosis terhadap Kandungan Protein Terlarut	20
3.	Uji Tukey Pengaruh Waktu dalam Dosis terhadap Kandungan Protein Terlarut	22
4.	Rataan Kandungan Kalsium Terlarut dari Masing-masing Perlakuan	23
5.	Uji Tukey Pengaruh Dosis terhadap Kandungan Kalsium Terlarut	25
6.	Rataan Kandungan Fosfor Terlarut dari Masing-masing Perlakuan	27
7.	Uji Tukey Pengaruh Dosis terhadap Kandungan Fosfor Terlarut	28
8.	Uji Tukey Pengaruh Waktu dalam Dosis terhadap Kandungan Fosfor	29

#### **BABI**

#### **PENDAHULUAN**

## 1.1. Latar Belakang

Indonesia tercatat sebagai negara penghasil udang terbesar ketiga di dunia, setiap tahunnya dihasilkan sekitar 0,08 juta ton. Sekitar 80% - 90% dari jumlah tersebut udang diekspor dalam bentuk udang beku, tanpa kepala dan kulit. Ekspor udang beku ke Jepang pada bulan November 2005 sebesar 3. 903 ton. Limbah yang dihasilkan dari proses pengolahan udang berkisar 60% - 70% dari berat udang (Krissetiana, 2004).

Udang windu (*Penaeus monodon*) merupakan komoditas perikanan yang banyak diekspor dalam bentuk udang beku. Negara tujuan ekspor terbesar adalah Jepang dan Amerika Serikat. Udang windu adalah salah satu udang *penaeid* (udang laut) terbesar di dunia dan merupakan barang dagangan komersil yang bernilai ekonomis tinggi (Motoh, 1986). Udang windu memiliki kulit tubuh yang keras, warna sekujur tubuhnya hijau kebiruan dengan motif loreng besar. Panjang udang windu hasil tangkapan dari laut bisa mencapai 35 cm dan beratnya 260 gram/ekor, apabila dipelihara ditambak panjangnya 20-25 cm dengan berat rata-rata 140 gram/ekor.

Pemanfaatan limbah udang sebagai pakan ternak dibatasi oleh adanya kitin yang mengikat protein dan mineral dalam limbah udang. Upaya untuk mengatasi masalah tersebut perlu dilakukan pengolahan terlebih dahulu. Pemisahan kitin dan protein serta mineral yang terkandung dalam limbah udang dapat dilakukan melalui dua proses, yaitu deproteinasi yang dilanjutkan demineralisasi atau sebaliknya. Proses deproteinasi adalah proses untuk melepaskan protein yang terikat pada kitin, adapun demineralisasi adalah proses untuk melepaskan mineral yang terikat pada kitin.

Pengolahan limbah udang sebagai pakan ternak dapat dilakukan dengan cara fisik, kimia dan biologis. Pengolahan dengan cara biologis adalah pengolahan dengan cara memanfaatkan mikroorganisme, seperti bakteri, jamur dan ragi. Pemilihan mikroorganisme yang digunakan sangat menentukan produk yang dihasilkan. Mikroorganisme yang digunakan dalam bioproses limbah udang harus memiliki sifat proteolitik dan dapat menciptakan suasana asam agar protein dan mineral dapat dipisahkan dari kitin.

Proses deproteinasi secara biologis dapat menggunakan *Bacillus licheniformis*, karena bakteri ini memiliki enzim kitinase thermofilik dengan sifat deproteinase sehingga protein yang terikat oleh kitin dapat terlepas. Setelah deproteinasi kemudian dilanjutkan dengan proses demineralisasi dengan menggunakan *Aspergillus niger*, karena pada saat pertama kali dimasukkan kapang ini dapat menciptakan suasana asam sehingga mendukung terjadinya proses demineralisasi.

Faktor yang berpengaruh terhadap kualitas produk bioproses dari limbah udang adalah tahapan prosesnya (deproteinasi kemudian demineralisæsi atau sebaliknya), waktu fermentasi, suhu, dosis inokulum dan pH. Dosis inokulum yang digunakan berpengaruh terhadap produk akhir, karena jumlah dosis menentukan jumlah enzim yang dihasilkan oleh mikroba yang digunakan. Semakin banyak dosis yang digunakan (pada dosis tertentu), semakin banyak enzim yang dihasilkan akibatnya produk yang dihasilkan semakin baik. Begitu pula semakin lama waktu fermentasi (pada waktu tertentu), kesempatan mikroba untuk memproduksi enzim semakin banyak, akibatnya akan menghasilkan produk akhir yang baik.

Jumlah protein dan mineral terlarut terbaik dapat diperoleh dengan menentukan dosis *Bacillus licheniformis* dan *Aspergillus niger* serta waktu dalam dosis bioproses yang digunakan dalam proses pengolahan limbah udang windu (*Penaeus monodon*).

Berdasarkan latar belakang di atas maka dilakukan penelitian tentang "Bioproses Limbah Udang Windu melalui Tahapan Deproteinasi dan Demineralisasi terhadap Protein dan Mineral Terlarut".

#### 1.2. Identifikasi Masalah

- a) Berapa besar pengaruh dosis inokulum pada tahapan deproteinasi oleh *Bacillus licheniformis* dan demineralisasi oleh *Aspergillus niger* pada limbah udang windu yang optimal terhadap protein dan mineral terlarut (kalsium dan fosfor).
- b) Pada waktu dalam dosis inokulum berapa dari tahapan deproteinasi oleh *Bacillus licheniformis* dan demineralisasi oleh *Aspergillus niger* pada limbah udang windu yang optimal terhadap protein dan mineral terlarut (kalsium dan fosfor).

### 1.3. Maksud dan Tujuan

- a) Mengetahui pengaruh dosis inokulum pada tahapan deproteinasi oleh *Bacillus licheniformis* dan demineralisasi oleh *Aspergillus niger* pada limbah udang windu yang optimal terhadap protein dan mineral terlarut (kalsium dan fosfor).
- b) Mendapatkan waktu dalam dosis inokulum dari tahapan deproteinasi oleh *Bacillus licheniformis* dan demineraliasi oleh *Aspergillus niger* pada limbah udang windu yang optimal terhadap protein dan mineral terlarut (kalsium dan fosfor).

#### 1.4. Kegunaan Penelitian

Hasil penelitian diharapkan dapat memberikan informasi dan pengetahuan tentang dosis inokulum dan waktu dalam dosis pada bioproses dengan tahapan deproteinasi oleh *Bacillus licheniformis* dan demineralisasi oleh *Aspergillus niger* pada pengolahan limbah udang windu (*Penaeus monodon*), serta pemanfaatan produknya untuk pakan unggas dan monogastrik.

#### **BAB II**

#### **KEPUSTAKAAN**

# 2.1. Udang Windu

Udang windu secara internasional dikenal sebagai *black tiger, tiger shrimp atau* atau *tiger prawn*. Istilah *tiger* ini muncul karena corak tubuhnya berupa garis-garis loreng mirip harimau, tetapi warnanya hijau kebiruan. Nama ilmiah udang windu adalah *Penaeus monodon* yang termasuk golongan *crustaceae* (udang-udangan) dan dikelompokkan sebagai udang laut atau udang penaide.

Taksonomi udang windu adalah sebagai berikut:

Phylum : Arthropoda

Sub phylum : *Mandibulata* 

Class : Crustaceae

Sub class : Malacostraca

Ordo : Decapoda

Sub ordo : Matantia

Famili : Penaidae

Genus : Penaeus

Species : Penaeus monodon

Udang windu memiliki kulit tubuh yang keras dari bahan kitin Tubuh udang windu dibagi menjadi dua bagian besar, yaitu bagian *cephalothorax* yang terdiri atas kepala dan dada dan bagian *abdomen* yang terdiri atas perut dan ekor. *Cephalothorax* dilindungi oleh kitin yang tebal atau disebut karapas. Bagian *cephalothorax* ini terdiri atas lima ruas kepala dan delapan ruas dada. Bagian *abdomen* terdiri atas enam ruas perut dan satu ekor. Bagian depan kepala yang menjorok merupakan kelopak kepala

yang memanjang dengan bagian pinggir bergerigi atau disebut juga dengan cucuk (rostrum). Cucuk di bagian kepala memiliki tujuh buah gerigi di bagian atas dan tiga buah gerigi di bagian bawah, sedangkan di bawah pangkal kepala terdapat sepasang mata.

# 2.1.1. Limbah Udang dan Pemanfaatannya sebagai Pakan Ternak

Indonesia tercatat sebagai negara penghasil udang terbesar ketiga di dunia, setiap tahunnya dihasilkan sekitar 0,08 juta ton. Sekitar 80% - 90% dari jumlah tersebut udang diekspor dalam bentuk udang beku, tanpa kepala dan kult. Limbah yang dihasilkan dari proses pengolahan udang berkisar 60% - 70% dari berat udang itu sendiri (Krissetiana, 2004).

Pemanfaatan limbah udang sebagai pakan ternak berdasarkan pada dua hal, yaitu jumlah dan mutunya. Seiring dengan maraknya ekspor udang beku ke beberapa negara, seperti Jepang, Taiwan, Amerika Serikat maka limbah yang dihasilkan akan bertambah pula. Limbah udang yang terdiri dari kepala dan kulit masih mempunyai kandungan nutrisi yang cukup tinggi, yaitu 25 – 40% protein, 45 – 50% kalsium karbonat, 15 - 20% kitin (Altschul, 1976). Selain itu mengandung karotinoid berupa *axtasantin*.

Potensi limbah udang sebagai pakan ternak penggunaannya dibatasi oleh adanya kitin, sehingga apabila limbah udang diberikan secara langsung sulit dicerna oleh ternak. Permasalahan tersebut dapat diatasi dengan melakukan pengolahan limbah udang baik secara kimiawi maupun biologis.

Pengolahan secara biologis dapat menggunakan bakteri, kapang dan jamur. Keuntungan pengolahan secara biologis adalah produk yang dihasilkan aman, ramah lingkungan serta memiliki kandungan gizi yang lebih baik jika dibandingkan dengan pengolahan secara kimiawi.

#### 2.1.2 . Kitin

Kitin merupakan senyawa biopolimer berantai panjang dan tidak bercabang. Tiap rantai polimer pada umumnya terdiri dari 2000 hingga 5000 unit monomer N-aseti-D-Glukosamin (2-acetamido-2-deoksi-D-Glukosa) yang terpaut melalui ikatan  $\beta$  (1,4) glukosa. Unit monomer kitin memiliki rumus molekul  $C_8H_{12}NO_5$  dengan kadar C 47%, H 6%, N 7% dan O 40% (Bastaman, 1989).

Kitin merupakan selulosa alami yang banyak terdapat pada hewan khususnya kulit udang, kepiting, rajungan (*crustaceae*) serta dinding sel bakteri dan fungi. Menurut Stephen (1995) kitin merupakan makromolekul berbentuk padatan amorf atau kristal dengan panas spesifik 0,373 kal/g/°C, berwarna putih, dapat terurai secara kimia dan hayati terutama oleh bakteri penghasil enzim lisozim dan kitinase. Kitin bersifat tidak larut dalam air, asam anorganik encer, asam organik, alkali pekat dan pelarut organik tetapi larut dalam asam pekat, seperti asam sulfat, asam nitrit, asam fosfat dan asam formiat anhidrous. Menurut Austin (1981) kitin yang larut dalam asam pekat dapat terdegradasi menjadi monomernya dan memutuskan gugus asetil.

Struktur kitin dan kitosan sama dengan selulosa, yaitu ikatan yang terjadi antara monomernya terangkai dengan glukosida pada posisi β (1,4). Perbedaannya dengan selulosa adalah gugus hidroksil yang terikat pada atom karbon nomor dua pada kitin digantikan oleh gugus asetamina (-NHCOCH<sub>3</sub>) sehingga kitin menjadi sebuah polimer berunit N-Asetil Glukosamin sedangkan pada kitosan digantikan oleh gugus amin (NH<sub>2</sub>). Berikut adalah gambar gugusan kimia kitin.

Kitin dapat dibedakan berdasarkan susunan rantai N-Asetil-Glukosamin yaitu  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , derajat deasetilasi, adanya ikatan silang seperti dengan protein dan glukan. Kitin dalam tubuh organisme terdapat dalam tiga bentuk kristal dan dibedakan atas susunan rantai molekul yang membangun kristalnya yaitu  $\alpha$  kitin (rantai antiparalel),  $\beta$  kitin (rantai paralel) dan  $\gamma$  kitin (rantai campuran) (Angka dan Suhartono, 2000)

#### 2.2. Fermentasi

# 2. 2.1. Arti dan Manfaat Fermentasi

Istilah fermentasi berasal dari bahasa latin yaitu *fervere* yang berarti mendidih. Istilah ini pertama kali digunakan untuk menerangkan terjadinya penggelembungan atau pendidihan yang terlihat pada pembuatan anggur (Saono, 1976). Dalam arti sempit fermentasi adalah suatu proses kimia dimana terjadi pembentukan gas dan busa (Sastrawihardja, 1981). Fermentasi dalam arti luas adalah proses perubahan kimia dari senyawa-senyawa organik (karbohidrat, protein, lemak dan bahan organik lain) melalui kerja enzim yang dihasilkan mikroba. (Gandjar, 1977).

Startleff dan Aoyagi (1979) membuktikan bahwa fermentasi adah hasil pengembangbiakan beberapa tipe mikroorganisme khususnya bakteri, ragi dan jamur pada media tertentu yang aktivitasnya menyebabkan perubahan kimia pada makanan tersebut. Perubahan tersebut disebabkan aktivitas enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme atau enzim yang berada dalam bahan pakan tersebut yang dikenal dengan enzim endogenous. Fermentasi juga dapat diartikan sebagai suatu proses dimana mikroorganisme atau enzim mengubah bahan-bahan organik komplek seperti protein, karbohidrat, lemak menjadi molekul-molekul yang lebih sederhana dan mudah dicerna (Winarno, 1993).

#### 2.2.2. Jenis Fermentasi

Menurut jenis mediumnya, proses fermentasi dibagi menjadi dua yaita fermentasi substrat padat dan fermentasi substrat cair. Fermentasi substrat padat adalah fermentasi dengan substrat yang tidak larut tetapi cukup mengandung air untuk keperluan mikroorganisme. Keuntungan fermentasi substrat padat antara lain prosesnya sangat sederhana, tidak diperlukan alat yang rumit, berkurangnya persoalan kontaminasi oleh mikroorganisme lain.

Fermentasi substrat cair adalah proses fermentasi yang substratnya larut atau tersuspensi dalam fase cair. Keuntungannya antara lain jumlah inokulum yang digunakan lebih sedikit, penanganan suhu dan kelembaban selama fermentasi lebih mudah untuk dikontrol (Setiawihardja, 1984).

# 2.2.3. Faktor-faktor yang Mempengaruhi Proses Fermentasi

Tujuan utama proses fermentasi pada dasarnya memperbanyak mikroorganisme dan meningkatkan metabolisme makanan (Winarno dan Fardiaz, 1980). Faktor yang menentukan keberhasilan proses fermentasi adalah suhu pertumbuhan, derajat keasaman (pH), ketebalan substrat, bentuk dan ukuran partikel, kelembaban, aerasi serta jumlah mikroba dalam inokulum (Saono, 1976).

#### 1. Air

Air merupakan faktor yang palig berpengaruh terhadap pertumbuhan mikroorganisme dan kelangsungan proses fermentasi. Mikroorganisme tidak akan tumbuh tanpa adanya air. Air bertindak sebagai pelarut dan sebagian besar aktivitas metabolik dalam sel dilakukan dalam lingkungan air Air juga berfungsi sebagai katalis dengan membantu atau terlibat langsung dalam beberapa reaksi enzimatis (Mahfud, 1989).

#### 2. Konsentrasi Substrat dan Nutrien

Semua mikroorganisme membutuhkan nutrien dasar sebagai sumber karbon, nitrogen, energi dan faktor esensial pertumbuhan, yaitu mineral dan vitamin untuk menyokong pertumbuhannya Media sebagai tempat tumbuh dan berkembangnya mikroorganisme harus mengandung semua unsur dan senyawa yang dibutuhkan oleh mikroba serta suplai karbon untuk sintesa protein (Wang, 1979)

# 3. Derajat Keasaman (pH)

Derajat keasaman (pH) merupakan petunjuk aktivitas ion H dalam suatu larutan. Pada proses fermentasi, pH meih sangat berpengaruh terhadap laju pertumbuhan mikroorganisme, fungsi membran, aktivitas enzim dan komponen sel lainnya (Rhem dan Reed, 1981). Selama proses fermentasi pH substrat cenderung mengalami perubahan. Hal ini mengakibatkan adanya pembentukan asam organik sebagai salah satu uraian substrat (Bucke, 1987). Setiap mikroorganisme mempunyai batas toleransi terhadap nilai pH maksimum dan pH minimum bagi pertumbuhannya. Pada selang nilai tersebut terdapat nilai pH yang mendukung pertumbuhan optimum (Shurtleff dan Aoyagi, 1979). Nilai pH untuk pertumbuhan mikroorganisme mempunyai hubungan dengan suhu. Jika suhu naik, pH optimum untuk pertumbuhan juga akan naik (Fardiaz, 1992).

# 4. Suhu

Suhu merupakan suatu faktor lingkungan yang sangat berpengaruh terhadap ukuran sel, produk metabolik serta pigmen dan toksin, kebutuhan zat gizi, reaksi enzimatik dan komposisi kimia sel. Suhu suatu lingkungan yang terlalu tinggi akan menyebabkan pertumbuhan jamur tertekan dan yang akan tumbuh adalah mikroorganisme lain (Wang, 1979).

#### 5. Konsentrasi Inokulum

Gandjar (1977) dan Tanuwidjadja (1975) menyatakan bahwa dosis inokulum merupakan faktor yang sangat penting, dalam lingkungan tertentu dosis inokulum yang digunakan menentukan panjang pendeknya waktu inkubasi untuk mendapatkan hasil fermentasi yang baik. Inokulum ini mengandung spora-spora yang pada pertumbuhannya menghasilkan enzim yang dapat menguraikan substrat menjadi komponen yang sederhana, lebih mudah larut, serta menghasilkan flavor dengan aroma yang khas. Jumlah spora yang terlalu sedikit akan mengakibatkan lambatnya laju pertumbuhan. Hal ini akan memberikan kesempatan kepada mikroba lain yang mampu bersaing dengan mikroorganisme yang ada. Jumlah mikroba yang terlalu banyak akan menyebabkan sporulasi yang terlalu cepat, sebagian energi tidak digunakan untuk memperbanyak sel.

#### 6. Aerasi

Aerasi bertujuan untuk mensuplai oksigen dan membuang karbondioksida pada proses fermentasi aerobik. Oksigen diperlukan sebagai suplai elektron terakhir dalam metabolisme untuk mendapatkan energi (Winarno dan Fardiaz, 1990). Aerasi yang baik adalah mengalirnya udara keseluruh bagian media.

# 7. Bentuk dan Ukuran Partikel

Bentuk dan ukuran partikel serta jumlah substrat menentukan distribusi spora secara merata dalam substrat. Keseragaman partikel akan mempermudah penyebaran spora yang diinokulasikan dalam substrat (Senez, 1979). Ukuran partikel yang terlalu kasar atau terlalu halus akan mempersulit aerasi

#### 8. Waktu Fermentasi

Pertumbuhan mikroba pada proses fermentasi ditandai dengan peningkatan jumlah masa sel seiring dengan lamanya waktu yang digunakan, sehingga konsentrasi metabolik semakin tinggi sampai akhirnya menjadi terbatas yang

kemudian dapat menyebabkan laju pertumbuhan menurun. Semakin lama waktu

yang digunakan maka kesempatan mikroba untuk memecah substrat semakin

banyak dan sebaliknya (Fardiaz, 1992).

2.3. Deproteinasi oleh Bacillus licheniformis

Deproteinasi adalah proses pelepasan protein dari ikatan kitin limbah udang.

Protein yang terdapat pada limbah udang dapat berikatan secara fisik dan kovalen.

Protein yang terikat secara kovalen dapat didegradasi dengan perlakuan kimia yaitu

pelarutan dalam larutan basa kuat atau dengan perlakuan biologis (Austin, 1988 dan Lee

and Tan, 2002).

Deproteinasi secara biologis dilakukan dengan menggunakan enzim protease,

yaitu enzim yang mampu menghidrolisis ikatan peptida dalam protein. Enzim protease

ini dapat diperoleh dari metabolit sekunder mikroba hasil kultivasi bakteri Bacillus

licheniformis (Bisping, 2005).

Klasifikasi bakteri Bacillus licheniformis menurut Buchanan, dkk (1979) adalah

sebagai berikut:

Kingdom : *Procaryotae* 

Divisi : Protophyta

Class : Schizomycetes

Ordo : Eubacteriales

Family: *Bacillaceae* 

Genus : Bacillus

Species : Bacillus licheniformis

Bacillus licheniformis merupakan bakteri gram positif, berbentuk batang dengan

panjang antara 1,5 µm sampai 3 µm dan lebar antara 0,6 µm sampai 0,8 µm. Suhu

optimum pertumbuhannya adalah 50-55<sup>0</sup> C, suhu minimumnya 15<sup>0</sup> C (Mao, dkk, 1992) dan diatas suhu 65<sup>0</sup> C tidak terjadi pertumbuhan (William, dkk, 1990). Bakteri *Bacillus licheniformis* bersifat fakultatif aerobik, artinya bakteri ini dapat hidup baik ada oksigen

maupun tidak ada oksigen. Namun pada kondisi anaerob pertumbuhan bakteri lebih

tinggi dibandingkan kondisi aerob.

# 2.4. Demineralisasi oleh Aspergillus niger

Demineralisasi adalah proses pelepasan mineral dari ikatan khitin, terutama mineral CaCO<sub>3</sub> dan CaPO<sub>4</sub>. mineral dapat terlepas dari ikatan kitin dengan terciptanya suasana asam. Salah satu mikroba yang dapat menciptakan suasana asam adalah *Aspergillus niger*. Berikut adalah klasifikasi *Aspergillus niger*:

Phylum : Eumytcophyta

Class : *Ascomycetes* 

Ordo : *Aspergilalles* 

Family: Aspergillaceae

Genus : Aspergillus

Species : Aspergillus niger

Kapang ini mempunyai ciri khas yaitu berupa kumpulan benangbenang tungggal yang disebut hypha atau kumpulan benang padat berwarna putih yang disebut *mycelium*, tidak mempunyai klorofil dan hidupnya heterotrof. Bersifat aerobik dan berkembang biak secara vegetatif dan generatif melalui pembelahan sel dan spora-spora yang dibentuk dalam *ascus* (kotak spora). Koloni yang tehh mengeluarkan spora biasanya berwarna hitam. Tumbuh optimum pada suhu sekitar 32-37° C dengan pH 2,8-8,8 dan kelembaban 80-90%. Menurut Gray (1970) penggunaan kapang *Aspergillus* 

dalam proses fermentasi suatu bahan tidak membahayakan karena kapang jenis Aspergillus tidak menghasilkan mikotoksin.

#### 2.5. Protein dan Mineral

Protein merupakan zat gizi yang amat penting, karena paling erat hubungannya dengan proses-proses kehidupan. Protein adalah sumber asam amino yang memiliki unsur-unsur C, H, O dan N yang tidak dimiliki oleh lemak atau karbohidrat. Fungsi utama protein adalah membentuk jaringan baru dan mempertaharkan jaringan yang telah ada (Winarno, 1977).

Berdasarkan bentuknya protein terdiri dari protein berbentuk bulat (albumin, glutelin, prolamin), protein berbentuk serat (kolagen, elastin, keratin, kitin) dan protein gabungan (nukleoprotein, lipoprotein, glikoprotein, mukoprotein, kromoprotein).

Penggunaan protein sebagai pakan pada hakekatnya adalah penggunaan asamasam amino yang terdapat dalam protein tersebut (Santoso, 1987) sedangkan menurut Yasin (1988) protein merupakan faktor yang essensial bagi kehidupan karena zat tersebut merupakan protoplasma aktif dalam semua sel hidup. Protein terdiri dari asamasam amino, sedangkan asam amino adalah zat-zat pembentuk utama untuk otot-otot, organ-organ tubuh, kulit dan bulu.

Mineral adalah unsur-unsur sederhana yang dibutuhkan tubuh dalam jumlah yang relatif kecil. Zat-zat mineral diperlukan untuk pembentukkan kerangka sebagai bagian hormon atau sebagai aktivator enzim, dan untuk pemelharaan keperluan osmotik yang tepat dalam tubuh. Kalsium dan fosfor merupakan mineral makro bagi ternak, khususnya unggas yang penting bagi pembentukkan dan pemeliharaan struktur kerangka tubuh.

#### **BAB III**

#### METODE PENELITIAN

#### 3.1. Bahan Penelitian

- 1. Substrat fermentasi
  - Substrat yang digunakan dalam penelitian ini adalah limbah udang windu (*Penaeus monodon*) berupa kepala dan kulit udang dari pengolahan udang beku.
- 2. Mikroba yang digunakan
  - Bacillus licheniformis digunakan dalam proses deproteinasi dan Aspergillus niger digunakan dalam proses demineralisasi..
- 3. Bahan lain adalah: Aquadest, Glukosa, Yeast ekstrak, Nutrien Broth, Potasium permanganat, Amonium oksalat, NaCl, Buffer pH 4, Buffer pH 7, Buffer pH 10, Bovin serum albumin, HCN 1 N, Larutan mineral.

#### 3.2. Alat Penelitian

- 1. Stoples *stenles*, berfungsi untuk menyimpan substrat (limbah udang) selama proses fermentasi.
- 2. Fermentor dan perlengkapannya (waterbath, termostat, termometer, water heater, aerator, shaker), alat untuk melakukan fermentasi,
- 3. *Autoclave*, berfungsi untuk mensterilkan alat dan bahan fermnetasi. Serilisasi dilakukan pada tekanan 1 Atm dan suhu 121°C selama 20 menit.
- 4. Alat lainnya adalah: Gelas piala, Pembakar bunsen, Cawan petri, Cawan porselin, Corong, PHmeter, *Spektrofotometer*, Tabung reaksi, Sentrifuse Nimac CR 21G, Erlenmeyer 125 ml, Neraca analitik dan digital, Sendok pengaduk, panci, kompor listrik, Kapas dan alumunium foil, *Beaker glass*, Pipet, Labu ukur, Kertas saring whatman, dan Buret.

#### 3.3. Prosedur Penelitian

# 1. Tahap Persiapan

Limbah udang (kulit dan kepala) dicuci dengan air supaya besih, kemudian lakukan sterilisasi menggunakan autoclave pada suhu 121  $^{0}$ C selama 20 menit dengan tekanan 1 atm.

# 2. Deproteinasi

# a. Pembuatan Nutrien Agar

Sebanyak 250 gram limbah udangi segar dicuci bersih, kemudian direbus dalam 1 liter aquadest sampai matang. Setelah matang air rebusan disaring dengan kain kasa bersih, ambil 500 ml kemudian ditambahkan 15 gram NaCl 0,9% dan 7 gram agar batang. Setelah itu disterilkan dengan menggunakan *autoclave* pada suhu 121 °C selama 20 menit tekanan 1 atm dan didinginkan. Media ini digunakan untuk perbanyakan *Bacillus licheniformis*.

# b. Perbanyakan Bakteri

Biakan murni *Bacillus licheniformis* diinokulasikan (dengan menggunakan jarum ose) ke dalam tabung reaksi yang berisi media Nutrien Agar (NA) steril, kemudian diinkubasi pada suhu 50  $^{0}$ C selama 24 jam.

#### c. Pembuatan Larutan Mineral

Campuran NH<sub>4</sub>Cl 0,5% (b/v), NaCl 0,5% (b/v), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,3% (b/v), KH<sub>2</sub>PO4 0,4% (b/v), MgCl. 6 H<sub>2</sub>O 0,1% (b/v) dan aquadest sampai volume campuran 1000 ml.

#### d. Pembuatan Inokulum

Limbah udang sebanyak 1 gram (berdasarkan bahan kering) ditambah 1 gram nutrient broth dan larutan mineral standar sampai volume campuran 90 ml, kemudian sterilisasi pada suhu 121 °C selama 20 menit tekanan 1 atm. Setelah itu dinginkan sampai suhunya sekitar 50 °C. Lalu tambahkan 1 ml biakan murni *Bacillus licheniformis* yang telah diencerkan 10 kali sehingga volume inokulum

100 ml. Atur pH pada pH 7,5. Setelah itu diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 50 °C. (jumlah koloni 10° per mililiter) Inokulum yang sudah jadi dihitung jumlah koloninya dengan menggunakan metode Total Plate Count (TPC).

# e. Lakukan fermentasi pada inkubator, dengan cara sebagai berikut :

Limbah udang (kepala dan kulit) diinokulasikan dengan inokulum sesuai dengan dosis (3, 4 dan 5 %) dan ditambah larutan mineral standar. Kenudian dimasukkan ke dalam stoples stenles dan diaduk sampai homogen. Stoples stenles ditutup dan diinkubasi selama 12, 24 dan 36 jam Setelah proses deproteinasi kemudian dilanjutkan dengan proses demineralisasi.

#### 3. Demineralisasi

# a. Pembuatan Media Ekstrak Toge Agar (ETA)

Sebanyak 250 gram toge (kacang ijo) yang sudah dicuci bersih dimasak dalam 1000 ml aquadest selama 2,5 jam. Kemudian disaring dengan kain kasa dan ekstraknya diambil 500 ml. Ekstrak toge (500 ml) kemudian diambah 15 gram sukrosa dan 7 gram agar batang kemudian disterilisasi menggunakan autoclave pada suhu 121 °C selama 20 menit tekanan 1 atm dan dinginkan. Media ini digunakan untuk perbanyakan kapang *Aspergillus niger*.

# b. Perbanyakan Kapang

Biakan murni *Aspergillus niger* diinokulasikan (dengan menggunakan jarum ose) ke dalam tabung reaksi yang berisi media ekstrak toge agar (ETA) steril, kemudian diinkubasi pada suhu 30 °C selama 72 jam.

#### c. Pembuatan Mineral Standar

Campuran 0,5% (b/v) ekstrak yeast, 0,5% (b/v) NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 0,05% (b/v) KCl, 0,05% (b/v) mgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,01% (b/v)FeSO<sub>3</sub>.7H<sub>2</sub>O dan 0,001% (b/v) CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, dan aquadest sampai volume campuran 1000 ml.

#### d. Pembuatan Inokulum

Limbah udang sebanyak 1 gram (berdasarkan bahan kering) ditambah 1 gram nutrient broth dan larutan mineral standar sampai volume campuran 90 ml, kemudian sterilisasi pada suhu 121 °C selama 20 menit tekanan 1 atm. Setelah itu dinginkan sampai suhunya sekitar 35 °C. Lalu tambahkan 1 ml biakan murni *Aspergillus niger* yang telah diencerkan 10 kali sehingga volume inokulum 100 ml. Atur pH pada 7 Setelah itu diinkubasikan selama 72 jam pada suhu 35 °C. (jumlah koloni 10° per mililiter) Inokulum yang sudah jadi dihitung jumlah koloninya dengan menggunakan metode Total Plate Count (TPC). Cara perhitungan jumlah koloni menggunakan metode TPC dapat dilihat pada Lampiran 2.

# e. Melakukan proses demineralisasi, dengan cara sebagai berikut

Limbah udang yang sudah mengalam deproteinasi ditambahkan inokulum *Aspergillus niger* sebanyak 1%, 2% dan 3% dan larutan mineral standar. Tutup stoples stenles dilubangi kemudian diinkubasi pada suhu 35 °C selama 48, 72 dan 96 jam. Setelah masing masing proses selesai kemudian dilakukan sterilisasi menggunakan autoclave dengan suhu 121 °C tekanan 1 atm selama 20 ment. Setelah itu disaring untuk memisahkan antara padatan dan cairan, kemudian cairan hasil penyaringan dianalisis kandungan protein dan mineral (kalsium dan fosfor) terlarutnya.

# 3.4. Peubah yang Diamati

- a) Protein terlarut.
- b) Kalsium terlarut
- c) Fosfor terlarut

Perhitungan kemampuan mikroba memecah substrat, yaitu:

Kemampuan mikroba (%) =  $\frac{K_2}{K_1}$  x 100%

Keterangan :  $K_1$  = komponen gizi (protein dan mineral ) sebelum ekstraksi  $K_2$  = komponen gizi (protein dan mineral ) setelah ekstraksi

# 3.5. Analisis Statistik dan Rancangan Percobaan

Penelitian ini dilaksanakan seara eksperimental dengan meggunakan rancangan tersarang, dimana faktor A yaitu dosis inokulum (dosis *Bacillus licheniformis* adalah  $D_1 = 3\%$ ,  $D_2 = 4\%$ ,  $D_3 = 5\%$  dan dosis *Aspergillus niger* adalah  $D_1 = 1\%$ ,  $D_2 = 2\%$ ,  $D_3 = 3\%$ ). Dan faktor B yaitu waktu fermentasi (waktu deproteinasi adalah  $W_1 = 12$  jam,  $W_2 = 24$  jam,  $W_3 = 36$  jam dan waktu demineralisasi adalah  $W_1 = 48$  jam,  $W_2 = 72$  jam,  $W_3 = 96$  jam). Faktor B (waktu) ersarang dalam faktor A (dosis) dan tiap perlakuan diulang sebanyak 3 kali. Penelitian ini terdiri atas dua tahap, yaitu tahap deproteinasi menggunakan *Bacillus licheniformis* yang dilanjutkan dengan proses demineralisasi menggunakan *Aspergillus niger* Perlakuan  $D_1W_1$  deproteinasi dilanjutkan dengan perlakuan  $D_1W_1$  demineralisasi setelah itu dilakukan analisis protein dan mineral (kalsium dan fosfor) terlarut. Untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan antar perlakuan dilanjutkan dengan uji Tukey.

# **BAB IV**

# HASIL DAN PEMBAHASAN

# 4.1. Pengaruh Perlakuan terhadap Kandungan Protein Terlarut

Rataan kandungan protein terlarut limbah udang hasil bioproses pada tahapan deproteinasi-demineralisasi setiap perlakuan dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Rataan Kandungan Protein Terlarut dari Masing-masing Perlakuan

		Ulangan			
Perlakuan	1	2	3	Jumlah	Rataan
			%		
W1D1	17,89	17,83	17,60	53,31	17,77
W2D1	22,28	22,26	21,81	66,35	22,12
W3D1	22,06	21,98	21,75	65,78	21,93
W1D2	22,96	22,85	22,64	68,45	22,82
W2D2	37,50	36,69	34,68	110,27	36,76
W3D2	35,47	37,42	35,34	106,85	35,62
W1D3	24,97	24,91	24,66	74,55	24,85
W2D3	35,13	34,89	34,46	104,48	34,83
W3D3	37,62	37,58	36,99	112,19	37,40

Ket: D1 = 3% Bacillus licheniformis., 1% Aspergillus niger

D2 = 4% Bacillus licheniformis., 2% Aspergillus niger

D3 = 5% Bacillus licheniformis., 3% Aspergillus niger

W1 = 12 jam deproteinasi., 48 jam demineralisasi

W2 = 24 jam deproteinasi., 72 jam demineralisasi

W3 = 36 jam deproteinasi., 96 jam demineralisasi,

Tabel 1 menunjukkan perbedaan rataan kandungan protein terlarut limbah udang hasil bioproses tahapan deproteinasi-demineralisasi. Perlakuan W3D3 menghasilkan nilai rataan kandungan protein terlarut paling tinggi yaitu sebesar 37,40%, kemudian berturut-turut W2D2 36,76%, W3D2 35,62%, W2D3 34,83%, W1D3 24,85%, W1D2 22,82%, W2D1 22,12%, W3D1 21,93% dan yang paling rendah adalah W1D1 sebesar 17,77%. Uji statistik melalui Sidik Ragam dilakukan untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap kandungan protein terlarut limbah udang hasil bioproses tahapan deproteinasi-demineralisasi .

Hasil analisis Sidik Ragam menunjukkan bahwa perlakuan dosis dan waktu dalam dosis berbeda nyata (P<0,05) terhadap kandungan protein terlarut limbah udang hasil bioproses deproteinasi-demineralisasi. Berapa besar perbedaan pengaruh dosis antar perlakuan terhadap kandungan protein terlarut limbah udang hasil bioproses tahapan deproteinasi-demineralisasi dapat diketahui dengan uji Tukey yang hasilnya dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Uji Tukey Pengaruh Dosis terhadap Kandungan Protein Terlarut

_	Perlakuan	Rataan Kandungan Protein Terlarut	Signifikasi 0,05
_		%	
	D3	32,36	a
	D2	31,73	a
	D1	20,60	b

Ket: huruf yang berbeda pada kolom signifikasi menunjukkan perbedaan yang nyata (P < 0.05)

Tabel 2 menunjukkan adanya perbedaan dari masing-masing perlakuan terhadap kandungan protein terlarut. D3 (5% *Bacillus licheniformis.*, 3% *Aspergillus niger*)

berbeda nyata dengan D1 (3% *Bacillus licheniformis.*, 1% *Aspergillus niger*), tetapi tidak berbeda nyata dengan D2 (4% *Bacillus licheniformis.*, 2% *Aspergillus niger*).

Dosis inokulum yang digunakan merupakan salah satu faktor yang menentukan kandungan protein terlarut limbah udang. Penggunaan dosis inokulum berhubungan erat dengan enzim yang dhasilkan oleh mikroba tersebut Tingginya dosis inokulum *Bacillus licheniformis* yang digunakan menghasilkan enzim kitinase yang lebih banyak. Akibatnya protein yang terlepas dari ikatan kitin lebih banyak

Perlakuan D1 (penggunaan 3% *Bacillus licheniformis* yang dilanjutkan dengan 1% *Aspergillus niger*) menghasilkan protein terlarut terendah, karena jumlah mikroba yang kurang optimum menghasilkan enzim yang sedikit dan pada gilirannya protein yang terlepas dari ikatan kitin akan sedikit pula.

Perlakuan D2 (penggunaan 4% *Bacillus licheniformis* dilanjutkan dengan 2% *Aspergillus niger*) dan D3 tidak berbeda nyata, meskipun kandungan protein terlarut D3 lebih tinggi namun secara staistik perbedaannya tidak berbeda nyata. Hal ini menunjukkan bahwa D2 merupakan dosis yang optimum untuk menghasilkan protein terlarut limbah udang hasil bioproses melalui tahapan deproteinasi-demineralisasi. Penggunaan dosis yang lebih besar dari D2, meningkatkan kandungan protein terlarut namun peningkatannya tidak berbeda nyata dan kandungan protein terlarut akan menurun pada dosis tertentu (yang nilainya lebih besar dibanding dengan D2). Hal ini sesuai dengan pendapat Tanuwidjadja (1975) yang menyatakan jumlah mikroba yang terlalu banyak akan menyebabkan sporulasi yang terlalu cepat sehingga sebagian energi tidak digunakan untuk memperbanyak sel.

Terlepasnya protein limbah udang dari ikatan kitin menunjuklan bahwa inokulum yang digunakan, yaitu *Bacillus licheniformis* menghasilkan enzim protease kitinolitik. Hal ini sesuai dengan pendapat Bisping (2005) yang menyatakan bahwa

enzim protease dapat diperoleh dari metabolit sekunder mikroba hasil kultivasi bakteri *Bacillus licheniformis*. Penambahan inokulum *Aspergillus niger* dapat memaksimalkan protein yang terlepas dari ikatan kitin, protein yang tidak terlepas oleh *Bacillus licheniformis* dapat dilepaskan oleh *Aspergillus niger* sehingga jumlah protein terlarut maksimal.

Besarnya perbedaan pengaruh waktu dalam dosis terhadap kandungan protein limbah udang diketahui dengan uji Tukey yang hasilnya dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Uji Tukey Pengaruh Waktu dalam Dosis terhadap Kandungan Protein Terlarut

Perlakuan	Rataan Kandungan Protein Terlarut	Signifikasi <sub>0,05</sub>
	%	
W2 D2	36,76	a
W3D2	35,62	a
W1D2	22,82	b

Ket: huruf yang berbeda pada kolom signifikasi menunjukkan perbedaan yang nyata (P<0.05)

Tabel 3 menunjukkan adanya perbedaan dari masing-masing perlakuan terhadap kandungan protein terlarut. W2 (deproteinasi 24 jam., demineralisasi 72 jam) berbeda nyata dengan W1 (deproteinasi 12 jam., demineralisasi 48 jam), tetapi tidak berbeda nyata dengan W3 (deproteinasi 36 jam., demineralisasi 96 jam).

Perlakuan D2W1 menghasilkan kandungan protein terlarut terendah, hal ini dikarenakan waktu fermentasi yang lebih singkat mengakibatkan terbatasnya kesempatan mikroba untuk tumbuh dan berkembang biak. sehingga protein yang dapat terlepas dari ikatan kitin sedikit. Perlakuan D2W3 kandungan protein terlarut lebih kecil

dibandingkan dengan perlakuan D2W2. Hal ini disebabkan nutrien pada substrat sudah habis sejalan dengan pendapat Wang dkk. (1979) bahwa laju pertumbuhan akan menurun karena kandungan zat-zat makanan yang ada pada substrat semakin berkurang dan konsentrasi metabolit semakin tinggi. Selain itu disebabkan karena kandungan protein produk fermentasi secara proporsional mengalami peningkatan sejalan dengan lama waktu fermentasi sampai batas waktu tertentu kemudian nenurun kembali (Sulaiman, 1988).

# 4.2. Pengaruh Perlakuan terhadap Kandungan Kalsium Terlarut

Rataan kandungan kalsium terlarut limbah udang hasil bioproses tahapan deproteinasi-demineralisasi setiap perlakuan dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Rataan Kandungan Kalsium Terlarut dari Masing-masing Perlakuan

		Ulangan			
Perlakuan	1	2	3	Jumlah	Rataan
			%		
W1D1	5,93	5,77	5,68	17,37	5,79
W2D1	6,36	6,36	5,88	18,59	6,20
W3D1	6,46	6,93	6,50	19,88	6,63
W1D2	7,50	6,90	7,74	22,13	7,38
W2D2	7,36	7,34	6,49	21,20	7,07
W3D2	6,35	6,24	7,46	20,05	6,68
W1D3	7,56	6,50	7,89	21,95	7,32
W2D3	6,49	7,59	7,75	21,83	7,28
W3D3	6,59	7,56	6,37	20,52	6,84

Tabel 4 menunjukkan perbedaan rataan kandungan kalsium terlarut linbah udang hasil bioproses tahapan deproteinasidemineralisasi. Perlakuan W1D2 menghasilkan nilai rataan kandungan kalsium terlarut paling tinggi yaitu sebesar 7,38%, kemudian berturut-turut W1D3 7,32%, W2D3 7,28%, W2D2 7,07%, W3D3 6,84%, W3D2 6,68%, W3D1 6,63%, W2D1 620% dan yang paling rendah adalah W1D1 sebesar 5,79%. Uji statistik melalui Sidik Ragam dilakukan untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap kandungan kalsium terlarut limbah udang hasil bioproses tahapan deproteinasi-demineralisasi.

Hasil analisis Sidik Ragam menunjukkan bahwa perlakuan dosis berbeda nyata (P<0,05) terhadap kandungan kasium terlarut limbah udang hasil bioproses deproteinasi-demineralisas, namun perlakuan waktu dalam dosis tidak berbada nyata (P>0,05). Hal ini disebabkan jarak waktu yang digunakan terlalu pendek, akibatnya setiap perlakuan waktu dalam dosis tidak menunjukkan adanya perbedaan yang nyata terhadap kandungan kalsium terlarut limbah udang hasil bioproses tahapan deproteinasi-demineralisasi.

Uji Tukey dilakukan untuk mengetahui berapa besar perbedaan pengaruh dosis antar perlakuan terhadap kandungan kalsium terlarut limbah udang hasil bioproses tahapan deproteinasi-demineralisasi. Hasilnya dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Uji Tukey Pengaruh Dosis terhadap Kandungan Kalsium Terlarut

Perlakuan	Rataan Kandungan Kalsium Terlarut	Signifikasi <sub>0,05</sub>
	%	
D3	7,15	a
D2	7,04	a
D1	6,21	b

Ket: huruf yang berbeda pada kolom signifikasi menunjukkan perbedaan yang nyata (P < 0.05)

Tabel 5 menunjukkan adanya perbedaan dari masing-masing perlakuan terhadap kandungan kalsium terlarut. D3 (5% *Bacillus licheniformis.*, 3% *Aspergillus niger*) berbeda nyata dengan D1 (3% *Bacillus licheniformis.*, 1% *Aspergillus niger*), tetapi tidak berbeda nyata dengan D2 (4% *Bacillus licheniformis.*, 2% *Aspergillus niger*).

Dosis inokulum yang digunakan merupakan salah satu faktor yang menentukan kandungan kalsium terlarut limbah udang. Penggunaan dosis inokulum berhubungan erat dengan enzim yang dihasilkan oleh mikroba tersebut, selain itu tingginya dosis inokulum *Aspergillus niger* yang digunakan dapat menurunkan pH lebih besar, sehingga kalsium yang terlepas dari ikatan kitin lebih banyak.

Perlakuan D1 (penggunaan 3% *Bacillus licheniformis* yang dilanjutkan dengan 1% *Aspergillus niger*) menghasilkan kalsium terlarut terendah, karena jumlah mikroba yang kurang optimum menyebabkan penurunan pH rendah, akhirnya kalsium yang terlepas dari ikatan kitin sedikit.

Perlakuan D2 (penggunaan 4% *Bacillus licheniformis* dilanjutkan dengan 2% *Aspergillus niger*) dan D3 tidak berbeda nyata, meskipun kandungan kalsium terlarut D3 lebih tinggi namun secara statistik perbedaannya tidak berbeda nyata. Hal tersebut

menunjukkan bahwa D2 merupakan dosis yang optimum untuk menghasilkan kalsium terlarut limbah udang hasil bioproses melalui tahapan deproteinasi-demineralisasi.

Penurunan kandungan kalsium pada dosis 2 dan dosis 3 yang sering dengan bertambahnya waktu disebabkan karena nutrisi yang diperlukan mikroba untuk tumbuh telah habis. Hal ini sesuai dengan pendapat Nurwantoro (1994) yang menyatakan bahwa apabila suatu sel mikroba ditumbuhkan pada suatu medium yang memenuhi syarat untuk tumbuh, maka mikroba tersebut akan mengadakan multiplikasi secara aseksual dengan pembelahan sel, proses tersebut berlangsung terus-menerus selama nutrisi, energi dan persyaratan lingkungan lain masih memenuhi syarat untuk tumbuh.

Waktu dalam dosis yang tinggi dapat menghasilkan kandungan kalsium yang lebih tinggi dibandingkan dengan waktu yang sama dalam dosis yang lebih rendah. Hal tersebut menunjukkan bahwa waktu yang diperlukan bergantung pada dosis yang digunakan. Tingginya dosis yang digunakan menyebabkan pendeknya waktu yang diperlukan untuk melepaskan kalsium dari ikatan kitin. Perlakuan W1D2 merupakan perlakuan yang optimal untuk menghasilkan kalsium terlarut. Kemampuan mikroba dalam melepaskan kalsium dari ikatan kitin adalah sebesar 90,99%.

# 4.3 Pengaruh Perlakuan terhadap Kandungan FosforTerlarut

Rataan kandungan fosfor terlarut limbah udang hasil bioproses tahapan deproteinasi-demineralisasi setiap perlakuan dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Rataan Kandungan Fosfor Terlarut dari masing-masing Perlakuan

		Ulangan			
Perlakuan	1	2	3	Jumlah	Rataan
	••••		%	•••••	
W1D1	1,12	1,13	1,15	3,40	1,13
W2D1	1,20	1,22	1,18	3,60	1,20
W3D1	1,20	1,41	1,21	3,82	1,27
W1D2	1,38	1,39	1,37	4,14	1,38
W2D2	1,50	1,50	1,55	4,55	1,52
W3D2	1,54	1,53	1,54	4,61	1,54
W1D3	1,48	1,40	1,46	4,34	1,45
W2D3	1,54	1,52	1,52	4,58	1,53
W3D3	1,54	1,55	1,53	4,62	1,54

Tabel 6 menunjukkan perbedaan rataan kandungan fosfor terlarut limbah udang hasil bioproses tahapan deproteinasi-demineralisasi. Perlakuan W3D2 dan W3D3 menghasilkan nilai rataan kandungan fosfor terlarut paling tinggi yaitu sebesar 1,54%, kemudian berturut-turut W2D3 1,53%, W2D2 1,52%, W1D3 1,45%, W1D2 1,38%, W3D1 1,27%, W2D1 1,20% dan yang paling rendah adalah W1D1 sebesar 1,13%. Uji statistik melalui Sidik Ragam dilakukan untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap kandungan fosfor terlarut limbah udang hasil bioproses tahpan deproteinasi-demineralisasi.

Hasil analisis Sidik Ragam menunjukkan bahwa perlakuan dosis dan waktu dalam dosis berbeda nyata (P<0,05) terhadap kandungan fosfor terlarut limbah udang

hasil bioproses deproteinasi-demineralisasi. Berapa besar perbedaan pengaruh dosis antar perlakuan terhadap kandungan fosfor terlarut limbah udang hasil bioproses tahapan deproteinasi-demineralisasi dapat diketahui dengan uji Tukey yang hasilnya dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 7. Uji Tukey Pengaruh Dosis terhadap Kandungan Fosfor Terlarut

Perlakuan	Rataan Kandungan Fosfor Terlarut	Signifikasi 0,05
	%	
D3	1,54	a
D2	1,52	a
D1	1,38	b

Ket: huruf yang berbeda pada kolom signifikasi menunjukkan perbedaan yang nyata (P < 0.05)

Tabel 7 menunjukkan adanya perbedaan dari masing-masing perlakuan terhadap kandungan fosfor terlarut. D3 (5% *Bacillus licheniformis.*, 3% *Aspergillus niger*) berbeda nyata dengan D1 (3% *Bacillus licheniformis.*, 1% *Aspergillus niger*), tetapi tidak berbeda nyata dengan D2 (4% *Bacillus licheniformis.*, 2% *Aspergillus niger*).

Dosis inokulum yang digunakan merupakan salah satu faktor yang menentukan kandungan fosfor terlarut limbah udang. Penggunaan dosis inokulum berhubungan erat dengan enzim yang dihasilkan deh mikroba tersebut. Tingginya dosis inokulum *Aspergillus niger* mampu menurunkan pH lebih besar sehingga menyebabkan fosfor yang terlepas dari ikatan kitin semakin banyak.

Perlakuan D1 (3% *Bacillus licheniformis*., 1% *Aspergillus niger*) menghasilkan fosfor terlarut terendah, karena jumlah mikroba yang sedikit menghasilkan enzim yang sedikit dan penurunan pH rendah akhirnya fosfor yang terlepas dari ikatan kitin sedikit.

Perlakuan D2 (4% Bacillus licheniformis., 2% Aspergillus niger) dan D3 (5% Bacillus licheniformis., 3% Aspergillus niger) tidak berbeda nyata, meskipun kandungan fosfor terlarut D3 bbih tinggi namun secara statistik perbedaannya tidak nyata. Hal ini menunjukkan bahwa D2 merupakan dosis yang opimum untuk menghasilkan fosfor terlarut limbah udang hasil bioproses melalui tahapan deproteinasi-demineralisasi. Penggunaan dosis yang lebih besar dari D2 akun meningkatkan kandungan fosfor terlarut namun peningkatannya tidak berbeda nyata dan kandungan fosfor terlarut akan menurun pada dosis tertentu. Hal ini sesuai dengan pendapat Tanuwidjadja (1975) yang menyatakan jumlah mikroba yang terlalu banyak akan menyebabkan sporulasi yang terlalu cepat sehingga sebagian energi tidak digunakan untuk memperbanyak sel.

Perbedaan kandungan fosfor terlarut akibat pengaruh waktu dalam dosis dapat dilihat pada Tabel 8.

Tabel 8. Uji Tukey Pengaruh Waktu dalam Dosis terhadap Kandungan Fosfor Terlarut

Perlakuan	Rataan Kandungan Fosfor Terlarut	Signifikasi <sub>0,05</sub>
	%	
W3D2	7, 12	a
W2D2	7,08	a
W1D2	6,74	b

Ket: huruf yang berbeda pada kolom signifikasi menunjukkan perbedaan yang nyata (P < 0.05)

Berdasarkan tabel di atas terlihat adanya perbedaan yang nyata kandungan fosfor terlarut antara W1 (deprotein**s**i 12 jam., demineralisasi 48 jam) dengan W2

(deproteinasi 24 jam ., deminœalisasi 72 jam) dan W3 (deproteinasi 36 jam., demineralisasi 96 jam) sedangkan perlakuan W2 tidak berbeda nyata dengan W3. Nilai fosfor bertambah seiring dengan bertambahnya waktu yang digunakan. Waktu yang lama memberikan kesempatan *Aspergillus niger* untuk menurunkan pH yang lebh besar. Akibatnya fosfor yang terlepæ dari ikatan kitin lebih banyak dibandingkan dengan waktu yang lebih pendek.

#### **BAB V**

#### KESIMPULAN DAN SARAN

# 5.1. Kesimpulan

Perlakuan W2D2 (deproteinasi deh *Bacillus licheniformis* pada dosis 4% selama 24 jam dilanjutkan dengan demineralisasi oleh *Aspergillus niger* pada dosis 2% selama 72 jam merupakan perlakuan yang optimal untuk menghasilkan protein dan mineral terlarut pada bioproses limbah udang windu *Penaeus monodon*). Hasil penelitian didukung oleh data sebagai berikut:

- a) Kandungan protein terlarut pada perlakuan W2D2 nyata (P<0,05) lebih tinggi bila dibanding dengan W1D2, namun tidak berbeda nyata dengan W3D2. Kandungan protein terlarut pada perlakuan W2D2 sebesar 36,76%
- b) Kandungan kalsium terlarut pada perlakuan W2D2 tidak nyata (P>0,05) bila dibanding dengan W1D2 dan W3D2. Kandungan kalsium terlarut pada perlakuan W2D2 sebesar 7,07%
- c) Kandungan fosfor terlarut pada perlakuan W2D2 nyata (P<0,05) lebih tinggi bila dibanding dengan W1D2, namun tidak berbeda nyata dengan W3D2. Kandungan fosfor terlarut pada perlakuan W2D2 sebesar 1,52%

# 5.2 Saran

Untuk mendapatkan kandungan protein dan mineral terlarut pada pengolahan limbah udang oleh *Bacillus licheniformis*, disarankan menggunakan dosis sebesar 4% dengan lama waktu 24 jam, dan dilanjutkan dengan *Aspergillus niger* pada dosis 2% selama 72 jam.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Abun 2003. Pengaruh Dosis Inokulum Aspergillus niger dan Lama Fermentasi Terhadap Perubahan Kandungan Protein dan Serat Kasar Ampas Umbi Garut. Fakultas Peternakan, Bandung.
- Austin, P., C.J., Brine, J.E. Castle, and J.P. Zikakis. 198. *Chitin*: New of Research. Science. 212: 749
- Bastaman, S. 1989. Studies on Degradation and Extraction of Chitin and Chitosan from Prawn Shell (Nephrops norvegicus). Thesis. The Departement of Mechanical, Manufacturing, Aeronautical and Chemical Engineering. Faculty of Engineering The Queen's University of Belfast.
- Bisping, B., G. Daun. and G. Hegan. 2005. Aerobik Deproteinization and Decalcification of Shrimp Wastes for Chitin Exaction. Discussion Forum "Prospect of Chitin Production and Aplication In Indonesia". Held on, 14<sup>th</sup> September 2005, BPPT 1<sup>th</sup> building, 9<sup>th</sup> floor, Jakarta.
- Buckle, K.A., R. A Erwadi., Fleet dan M. Wooton. 1987. Ilmu Pangan. Diterjemahkan oleh Purnomo dan Adiono. Penerbit Universitas Indonesia, Jakarta.
- Dwidjoseputro, D. 1987. Dasar-dasar Mikrobiologi. Djembatan, Malang.
- Fardiaz, S. 1990. Fisiologi Fermentasi. Pusat Antar Universitas. IPB. Bogor.
- Fatihiyah, S. R. 2006. Deproteinasi Kulit Udang Secara Fermentasi Menggunakan Isolat Bacillus licheniformis F11 pada Ekstraksi Kitin. Institut Tekniligi Bogor.
- Gaspersz, Vincent. 1991. Teknik Analisis Dalam Penelitun Percobaan. Tarsito, Bandung.
- Judoamidjojo, R.M., E. G. Said dan L. Hartono. 1989. *Biokonversi*. PAU Bioteknologi IPB, Bogor
- Krissetiana, H. 2004. Khitin dan Khitosan dari Limbab Udang. H.U. Suara Merdeka.
- Moat, A. G. 1979. *Microbial Physiologi*. Johr Willey and Sons Inc. New York
- Motoh, H. 1986. *Biology and Ecology of Penaeus monodon* SEAFDEC Asian Aquaculture. Vol 8 no 2 : 3 7.

- Muzzarelli, R. A. A. and P. P. Joles. 1999. *Chitin and Chitinases*. Biochemistry of Chitinase. Switzerland: Bikhauser Verlag.
- Raharjo, Y. C. 1985. *Nilai Gizi Cangkang Udang dan Pemanfaatannya Untuk Itik.* Seminar Nasional Peternak Unggas (Prosiding). Balai Penelitian Ternak Ciawi, Bogor: 96 102.
- Raper, K. B., and D. I. Fennel. 1977. *The Genus Aspergillus*. The William and Wilking Co. Baitimore.
- Simanjuntak, S.D.D.1998. Penggunaan Aspergillus niger Untuk Meningkatkan Nilai Gizi Bungkil Inti Sawit dalam Ransum Broiler. Thesis. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Wang, D. I. C., C. L. Cooney., A. L. Demein. 1979. Fermentation and Enzymes Tecnology. John and Sons Inc.
- Williams, C.M., J.CH. Shih. 1989. Enumeration of Some Microbial Groups In Thermophilic Poultry Waste Disasters and Enrichment of a Feather- Degrading Culture. J. Appl. Bacteriol 67: 25 35.
- Winarno, F.G dan S. Fardiaz. 1990. *Pengantar Teknologi Pangan*. PT Gramedia. Jakarta.