

Kandungan Asam Amino Tepung Bulu Ayam yang Difermentasi dengan *Bacillus licheniformis* B2560 dan *Bacillus subtilis* Sebagai Bahan Baku Pakan Ikan

Amino Acid Content of Fermented Chicken Feather Flour with Bacillus licheniformis B2560 and Bacillus subtilis as Raw Material for Fish Feed

Dini Siswani Mulia^{1*}, Arief Husin², Juli Rochmijati Wuliandari³

^{1,2,3}Pendidikan Biologi, Universitas Muhammadiyah Purwokerto

*corr-author: dinisiswanimulia@ump.ac.id

ABSTRAK

Kualitas pakan ikan salah satunya ditentukan oleh kandungan protein dan asam amino. Penelitian bertujuan untuk mengkaji kandungan asam amino tepung bulu ayam yang difermentasi dengan *Bacillus licheniformis* B2560 dan *Bacillus subtilis* sebagai bahan baku pakan ikan. Penelitian menggunakan metode eksperimen dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial, yaitu perlakuan I : fermentasi (A1 : kontrol/non fermentasi, A2 : fermentasi dengan *B. licheniformis* B2560, A3 : fermentasi dengan *B. subtilis*), dan perlakuan II : jumlah inokulum (B1 : jumlah inokulum 5 mL, B2 : jumlah inokulum 10 mL, B3 : jumlah inokulum 15 mL, masing-masing untuk tepung bulu ayam sebanyak 2 g). Parameter penelitian yang diamati adalah kandungan asam amino. Data dianalisis menggunakan *Analysis of Variance* (Anova) dan dilanjutkan dengan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf uji 5%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa fermentasi tepung bulu ayam menggunakan *B. licheniformis* B2560 dapat meningkatkan kandungan beberapa jenis asam amino lebih tinggi dibandingkan dengan *B. subtilis*. Jumlah inokulum 15 mL lebih optimal dalam mendegradasi protein keratin menjadi asam amino. Jenis asam amino dengan kandungan yang sesuai untuk kebutuhan ikan adalah asam glutamat, serin, glisin, treonin, arginin, tirosin, valin, fenilalanin, isoleusin, dan leusin.

Kata-kata kunci: asam amino, *Bacillus licheniformis* B2560, *Bacillus subtilis*, fermentasi, tepung bulu ayam

ABSTRACT

One of the quality of fish feed is determined by the content of protein and amino acids. This study aimed to assess the amino acid content of chicken feather flour fermented with Bacillus licheniformis B2560 and Bacillus subtilis as raw material for fish feed. Research using experimental methods with completely randomized design (CRD) factorial pattern, namely the treatment I: fermentation (A1: control / non fermentation, A2: fermentation with B. licheniformis B2560, A3: fermentation with B. subtilis), and treatment II: number inoculum (B1: the amount of inoculum of 5 mL, B2: the amount of inoculum 10 mL, B3: the amount of inoculum 15 mL, respectively for chicken feather meal as much as 2 g). Parameter research measured were the amino acid content. Data were analyzed using Analysis of Variance (ANOVA) followed by Duncan Multiple Range Test (DMRT) at the test level of 5%. The results showed that fermentation using chicken feather meal B.

licheniformis B2560 can improve the content of some types of amino acids is higher compared to B. subtilis. The amount of inoculum 15 mL is optimal in degrading keratin protein into amino acids. Amino acids with content appropriate to the needs of the fish is glutamic acid, serine, glycine, threonine, arginine, tyrosine, valine, phenylalanine, isoleucine, and leucine.

Keywords : *amino acids, Bacillus licheniformis B2560, Bacillus subtilis, chicken feather meal, fermentation*

PENDAHULUAN

Sebagian besar penduduk Indonesia menyukai daging ayam sebagai lauk pauk favorit keluarga. Banyak sekali restoran atau rumah makan siap saji yang menggunakan daging ayam sebagai menu andalan. Hal ini dikarenakan olahan daging ayam memiliki cita rasa yang enak, digemari semua kalangan usia, dan harganya yang relatif terjangkau. Selain itu, peningkatan kesejahteraan dan kesadaran masyarakat terhadap pentingnya protein hewani, turut memicu peningkatan konsumsi daging ayam yang berdampak pada peningkatan produktivitas daging ayam setiap tahunnya. Pada tahun 2015, produksi ayam ras pedaging mencapai 1.628.307 ton dan meningkat pada 2017 mencapai 3.175.853 ton. Pada tahun 2018, produksi meningkat lagi menjadi 3.409.558 ton, dan meningkat lagi pada tahun 2019 mencapai 3.495.090,53 ton (BPS, 2020a).

Tingkat konsumsi daging ayam secara nasional setiap tahun mengalami peningkatan. BPS (2020b) mencatat konsumsi daging ayam ras/kampung pada tahun 2019 mencapai 0,124 per kg/kapita/minggu, yang mengalami peningkatan dibandingkan tahun 2018, yaitu 0,121 per kg/kapita/minggu. Tingginya konsumsi daging ayam berdampak pada limbah bulu ayam yang dihasilkan, terutama oleh rumah pemotongan ayam (RPA). Setiap harinya, setiap RPA menghasilkan limbah bulu ayam sekitar 4-5% dari bobot hidup ayam pedaging (Sa'adah *et al.*, 2013). Begitu banyaknya limbah bulu ayam yang dihasilkan, maka perlu pengelolaan bulu ayam yang baik agar keberadaannya tidak sampai mencemari lingkungan. Selama ini, limbah bulu ayam telah dimanfaatkan sebagai pupuk dan bahan kemoceng (Abubakar *et al.*, 2000), juga sebagai alternatif pakan ternak (Supriyati *et al.*, 2000). Bulu ayam sangat potensial dijadikan bahan baku pakan ternak, termasuk pakan ikan, karena memiliki kandungan protein yang tinggi, mencapai 74,4-91,8% dari bahan kering (Puastuti, 2004). Bahkan hasil penelitian lain mencatat bahwa bulu ayam yang belum diolah memiliki kadar protein kasar sebesar 98,68% (Supriyati *et al.*, 2000). Zerdani *et al.* (2004) melaporkan komposisi kimia tepung bulu ayam yang belum difermentasi adalah 81% protein, 1,2% lemak, 86% bahan kering, dan 1,3% abu. Selain itu, tepung bulu ayam juga mengandung mineral kalsium 0,19%, fosfor 0,04%, kalium 0,15% dan sodium 0,15% (Kim & Patterson, 2000).

Namun, pemanfaatan bulu ayam sebagai bahan baku pakan ternak terkendala oleh jenis proteinnya yang sulit dicerna, yaitu protein keratin (Joshi *et al.*, 2007). Protein keratin merupakan produk pengerasan jaringan epidermal tubuh seperti kuku, rambut, dan bulu yang tersusun atas protein serat (*fibrous*), kaya akan sistein dan sistin (Sinoy *et al.*, 2011). Keratin tersusun atas 14% ikatan disulfida sehingga menjadi sangat stabil, kaku, dan tidak dapat dicerna dengan baik oleh enzim proteolitik seperti tripsin, pepsin, dan papain yang terdapat dalam organ pencernaan (Mazotto *et al.*, 2011). Daya cerna protein keratin bulu ayam dalam organ pencernaan hewan ruminansia hanya sebesar 5,8% (Achmad, 2001). Rendahnya daya cerna protein tersebut menjadi satu kendala untuk menjadikan bulu ayam sebagai sumber protein pakan ternak. Oleh karena itu, untuk meningkatkan kualitas tepung

bulu ayam sebagai bahan baku pakan ikan, terlebih dahulu tepung bulu ayam harus difermentasi.

Fermentasi bulu ayam dapat menggunakan jenis bakteri *Bacillus* sp. (Tiwary & Gupta, 2012). *Bacillus* sp. yang potensial mendegradasi keratin bulu ayam adalah *Bacillus licheniformis* (Zerdani *et al.*, 2004) dan *B. subtilis* (Madigan, 2005). Sebelum difermentasi, bulu ayam terlebih dahulu dibuat tepung agar hasil fermentasi lebih optimal. Tiwary & Gupta (2012) menggunakan *B. licheniformis* ER-15 untuk mendegradasi bulu ayam. Hasil penelitian menunjukkan terjadinya kenaikan protein dari 57,8% menjadi 73,4%. Sinoy *et al.* (2011) menyatakan bahwa enzim keratinase yang dihasilkan oleh bakteri jenis *Bacillus* tergolong enzim ekstraseluler. Enzim tersebut mampu menghidrolisis berbagai protein larut dan protein tidak larut seperti protein keratin. Hasil dari degradasi keratin dan penguraian protein, dapat meningkatkan asam amino yang terdeteksi dengan terukurnya asam amino setelah bulu ayam difermentasi.

Sebelumnya, Mulia *et al.* (2014) telah meneliti peningkatan kadar protein tepung bulu ayam setelah difermentasi dengan *B. licheniformis* B2560 yaitu mencapai 78,52-84,08 %, dibandingkan kadar protein tepung bulu ayam yang tidak difermentasi, yaitu 73,56 % sedangkan tepung bulu ayam yang difermentasi dengan *B. subtilis* memiliki kadar protein berkisar 78,51-80,59% (Mulia *et al.*, 2013). Dalam penelitian ini, akan dikaji kandungan asam amino tepung bulu ayam setelah difermentasi oleh kedua jenis bakteri tersebut. Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji kandungan asam amino tepung bulu ayam yang difermentasi dengan *B. licheniformis* B2560 dan *B. subtilis* sebagai bahan baku pakan ikan.

METODE PENELITIAN

1. Bahan dan Alat Penelitian

Bahan penelitian meliputi bahan uji dan bahan kimia. Bahan uji berupa bulu ayam diperoleh dari limbah RPA Citra, di Desa Dampit, Kembaran, Banyumas, bakteri *B. licheniformis* B2560 diperoleh dari Balai Besar Penelitian Veteriner Bogor, dan bakteri *B. subtilis* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto. Bahan kimia meliputi medium *nutrient agar* (NA), *nutrient broth* (NB), *brain heart infusion* (BHI), *luria broth agar* (LBA), peptone water, akuades, alkohol, dan larutan NaCl 0,1 M. Peralatan penelitian meliputi gelas ukur, Erlenmeyer, mikropipet, cawan petri, jarum ose, drugalsky, bunsen, timbangan analitik, wadah plastik, ember, mesin penggilingan, sprayer, pH meter, *laminar air flow* (LAF), autoklaf, inkubator, *filler pump*, *hot plate*, dan vortex.

2. Rancangan Penelitian

Penelitian menggunakan metode eksperimen dengan rancangan acak lengkap (RAL) pola faktorial, yaitu perlakuan I : fermentasi (A1 : kontrol/non fermentasi, A2: fermentasi dengan *B. licheniformis* B2560, A3 : fermentasi dengan *B. subtilis*), dan perlakuan II : jumlah inokulum (B1 : jumlah inokulum 5 mL, B2 : jumlah inokulum 10 mL, B3 : jumlah inokulum 15 mL, masing-masing untuk tepung bulu ayam sebanyak 2 g).

3. Prosedur Penelitian

a. Perbanyak Biakan *B. licheniformis* B2560 dan *B. subtilis*

Sebelum dilakukan perbanyak bakteri, terlebih dahulu dilakukan purifikasi *B. licheniformis* B2560 dan *B. subtilis*, dengan menggunakan medium NA. Perbanyak *B. licheniformis* B2560 mengacu pada Mulia *et al.* (2014) dan *B. subtilis* mengacu pada Mulia *et al.* (2016).

b. Pembuatan Tepung Bulu Ayam

Bulu ayam yang sudah bersih dijemur sampai kering, selanjutnya digiling menggunakan mesin giling. Hasil penggilingan bulu ayam akan diperoleh tepung bulu ayam.

c. Fermentasi Tepung Bulu Ayam

Sebanyak 2 g tepung bulu ayam yang telah disterilisasi dicampurkan dengan masing-masing inokulum *B. licheniformis* 2560 dan *B. subtilis*, sebanyak 5 mL, 10 mL, dan 15 mL ke dalam Erlenmeyer pada pH 8,5 dan diinkubasi dalam inkubator pada suhu 55°C selama 72 jam (Mulia *et al.*, 2014; 2016).

d. Parameter Penelitian dan Analisis Data

Parameter penelitian adalah kandungan asam amino. Data dianalisis menggunakan *Analysis of Variance* (Anova) dan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf uji 5%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Asama amino terdiri dari 2 jenis, yaitu asam amino esensial dan non esensial. Keduanya merupakan komponen utama penyusun protein. Secara umum, protein dan asam amino harus ada dalam ransum ataupun pakan hewan, tidak terkecuali pakan ikan. Hal ini karena dibutuhkan untuk pertumbuhan, memperbaiki atau mempertahankan jaringan, membentuk berbagai pesenyawaan biologis aktif tertentu dan sumber energi (Subandiyono & Hastuti, 2009). Hasil penelitian menunjukkan bahwa fermentasi berpengaruh terhadap kandungan asam amino. Secara umum terjadi peningkatan asam amino pada tepung bulu ayam yang difermentasi, baik dengan *B. licheniformis* B2560 maupun *B. subtilis*. Hasil penelitian menunjukkan ada 15 jenis asam amino yang berhasil diukur pada setiap perlakuan penelitian, 9 di antaranya termasuk asam amino esensial, yaitu histidin, treonin, arginin, metionin, valin, fenilalanin, isoleusin, leusin, dan lisin, sedangkan 6 di antaranya termasuk asam amino non esensial, yaitu asam aspartat, asam glutamat, serin, glisin, alanin, dan tirosin (Craig, 2017).

1. Asam Aspartat

Kandungan asam aspartat tepung bulu ayam fermentasi dan non fermentasi berkisar antara 2,66-4,52 %. Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa fermentasi, jumlah inokulum, dan interaksinya berpengaruh nyata ($P < 0,05$) terhadap kandungan asam aspartat tepung bulu ayam. Fermentasi tepung bulu ayam dengan *B. subtilis* memiliki kandungan asam aspartat paling tinggi dan berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan tepung bulu ayam yang difermentasi dengan *B. licheniformis* B2560 dan tepung bulu ayam non fermentasi (Tabel 1). Hal ini diduga *B. subtilis* lebih mampu menguraikan protein keratin bulu ayam menjadi asam aspartat dibandingkan *B. licheniformis* B2560.

Tabel 1. Pengaruh fermentasi terhadap kandungan asam amino

Fermentasi	Asam Aspartat	Asam Glutamat	Serin	Histidin	Glisin	Treonin	Arginin	Alanin
A1	3,308 ^a	5,460 ^a	5,290 ^a	0,250 ^b	3,570 ^b	2,320 ^a	3,530 ^a	1,920 ^a
A2	3,520 ^b	6,363 ^c	6,460 ^c	0,227 ^a	4,563 ^c	2,957 ^c	4,283 ^c	2,377 ^c
A3	3,910 ^c	6,317 ^b	5,943 ^b	0,280 ^c	3,527 ^a	2,800 ^b	4,027 ^b	2,313 ^b

Keterangan : angka yang diikuti huruf superscript yang berbeda menunjukkan berbeda nyata pada DMRT dengan taraf uji 5%. A1 = kontrol (non fermentasi), A2 = fermentasi dengan *B. licheniformis* B2560, A3 = fermentasi dengan *B. subtilis*

Tabel 2 menunjukkan bahwa perlakuan jumlah inokulum 15 mL menghasilkan kandungan asam aspartat yang lebih tinggi dan berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan perlakuan jumlah inokulum 10 mL dan 5 mL. Dalam penelitian ini, semakin banyak jumlah inokulum, kandungan asam aspartat semakin tinggi. Hal ini diduga, pada perlakuan B3, inokulum yang berperan dalam menguraikan protein menjadi asam aspartat seimbang dengan jumlah sampel yang difermentasi.

Tabel 2. Pengaruh jumlah inokulum terhadap kandungan asam amino

Jumlah inokulum	Asam Aspartat	Asam Glutamat	Serin	Histidin	Glisin	Treonin	Arginin	Alanin
B1	3,127 ^a	5,927 ^b	5,707 ^b	0,263 ^b	4,267 ^c	2,660 ^b	3,923 ^b	2,107 ^a
B2	3,555 ^b	5,803 ^a	5,477 ^a	0,247 ^a	3,447 ^a	2,533 ^a	3,687 ^a	2,133 ^b
B3	4,057 ^c	6,410 ^c	6,510 ^c	0,247 ^a	3,947 ^b	2,883 ^c	4,230 ^c	2,370 ^c

Keterangan : angka yang diikuti huruf superscript yang berbeda menunjukkan berbeda nyata pada DMRT dengan taraf uji 5%. B1 = 5 mL inokulum, B2 = 10 mL inokulum, B3 = 15 mL inokulum

Interaksi antar perlakuan menunjukkan bahwa perlakuan tepung bulu ayam yang difermentasi dengan 15 mL inokulum *B. licheniformis* B2560 (A2B3) dan *B. subtilis* (A3B3) menghasilkan kandungan asam aspartat yang paling tinggi (Tabel 3). Kandungan asam aspartat dalam penelitian ini lebih rendah dari kandungan asam aspartat 10 contoh tepung ikan, berkisar 2,99-5,90%, tetapi masih lebih tinggi dari 10 contoh tepung kedelai, mencapai 2,71-4,10% (Sitompul, 2004). Perbedaan tersebut disebabkan karena perbedaan bahan baku.

Tabel 3. Pengaruh fermentasi dan jumlah inokulum terhadap kandungan asam amino

Interaksi Perlakuan	Asam Aspartat	Asam Glutamat	Serin	Histidin	Glisin	Treonin	Arginin	Alanin
Kontrol	3,310 ^b	5,460 ^a	5,323 ^c	0,250 ^b	3,570 ^c	2,330 ^a	3,530 ^c	1,920 ^a
A2B1	2,660 ^a	6,810 ^d	6,850 ^e	0,280 ^{cd}	6,310 ^g	3,300 ^{cd}	4,850 ^g	2,460 ^c
A2B2	3,380 ^{bc}	5,490 ^b	5,120 ^b	0,200 ^a	3,080 ^b	2,430 ^a	3,460 ^b	2,030 ^b
A2B3	4,520 ^d	6,790 ^d	7,410 ^f	0,200 ^a	4,300 ^f	3,140 ^{bc}	4,540 ^e	2,640 ^e
A3B1	3,410 ^{bc}	5,510 ^b	4,980 ^a	0,260 ^{bc}	2,920 ^a	2,360 ^a	3,390 ^a	1,940 ^a
A3B2	3,597 ^c	6,460 ^c	6,020 ^d	0,290 ^d	3,690 ^d	2,850 ^b	4,070 ^d	2,450 ^c
A3B3	4,340 ^d	6,980 ^e	6,830 ^e	0,290 ^d	3,970 ^e	3,453 ^d	4,620 ^f	2,550 ^d

Keterangan : angka yang diikuti huruf superscript yang berbeda menunjukkan berbeda nyata pada DMRT dengan taraf uji 5%. A1 = kontrol (non fermentasi), A2 = fermentasi dengan *B. licheniformis* B2560, A3 = fermentasi dengan *B. subtilis*, B1 = 5 mL inokulum, B2 = 10 mL inokulum, B3 = 15 mL inokulum.

2. Asam Glutamat

Kandungan asam glutamat tepung bulu ayam fermentasi dan non fermentasi berkisar antara 5,460-6,980 %. Hasil penelitian menunjukkan bahwa fermentasi, jumlah inokulum, dan interaksinya juga berpengaruh nyata ($P < 0,05$) terhadap kandungan asam glutamat tepung bulu ayam. Namun, berbeda dengan asam aspartat, fermentasi tepung bulu ayam dengan *B. licheniformis* B2560 menghasilkan kandungan asam aspartat paling tinggi dan berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan tepung bulu ayam yang difermentasi dengan *B. subtilis* maupun tepung bulu ayam non fermentasi (Tabel 1). Hal ini diduga bahwa *B. licheniformis* B2560 lebih mampu menguraikan protein keratin bulu ayam menjadi asam glutamat dibandingkan *B. subtilis*.

Jumlah inokulum 15 mL pada fermentasi tepung bulu ayam menghasilkan asam glutamat yang lebih tinggi dan berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan penggunaan inokulum 10 dan 5 mL. Interaksi antar perlakuan menunjukkan bahwa perlakuan tepung bulu ayam yang difermentasi dengan 15 mL inokulum *B. subtilis* (A3B3) menghasilkan kandungan asam glutamat yang paling tinggi. Kandungan asam glutamat dalam penelitian ini tidak terlalu berbeda jauh dengan kandungan asam glutamat 10 contoh tepung ikan, berkisar 4,10-8,10%, dan 10 contoh tepung kedelai, mencapai 3,81-7,30% (Sitompul, 2004).

3. Serin

Kandungan serin tepung bulu ayam berkisar antara 4,980-7,410 %. Perlakuan tepung bulu ayam yang difermentasi dengan *B. licheniformis* B2560 memiliki kandungan serin yang lebih tinggi, dan berbeda nyata ($P < 0,05$) dibandingkan perlakuan A1 dan A3. Jumlah inokulum tertinggi (15 mL) menghasilkan serin yang lebih tinggi juga. Interaksi antara perlakuan menunjukkan bahwa perlakuan tepung bulu ayam yang difermentasi dengan 15 mL inokulum *B. licheniformis* B2560 (A2B3) menghasilkan kandungan serin yang paling tinggi dan berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan interaksi perlakuan lainnya. Kandungan serin dalam penelitian ini lebih tinggi dibandingkan kandungan serin 10 contoh tepung ikan, yaitu berkisar 1,20-3,75%, dan 10 contoh tepung kedelai, mencapai 1,19-2,68% (Sitompul, 2004).

4. Histidin

Kandungan histidin tepung bulu ayam berkisar antara 0,200-0,290 %. Perlakuan tepung bulu ayam yang difermentasi dengan *B. subtilis* memiliki kandungan histidin yang lebih tinggi, dan berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan fermentasi *B. licheniformis* B2560 dan kontrol. Berbeda dengan kandungan asam amino lainnya, perlakuan inokulum 5 mL menghasilkan kandungan histidin yang lebih tinggi. Interaksi antara perlakuan menunjukkan bahwa perlakuan tepung bulu ayam yang difermentasi dengan 5 mL inokulum *B. licheniformis* B2560 (A2B1), dengan 10 mL dan 15 mL inokulum *B. subtilis* (A3B2 & A3B3) menghasilkan kandungan histidin relatif sama dan paling tinggi dibandingkan perlakuan lainnya.

Kebutuhan histidin beberapa spesies ikan adalah 1,5-2,1% (Wilson, 1985), sedangkan menurut NRC (2011), berkisar antara 0,42-0,70%. Berdasarkan data tersebut, kadar histidin sampel penelitian ini di bawah kadar yang diharapkan. Histidin merupakan asam amino esensial bagi pertumbuhan larva dan anak-anak ikan. Histidin diperlukan untuk menjaga keseimbangan nitrogen dalam tubuh (Buwono, 2000). Kandungan histidin dalam penelitian ini lebih rendah dari kandungan histidin 10 contoh tepung ikan, berkisar 0,50-0,99%, dan 10 contoh tepung kedelai, berkisar 0,51-1,10% (Sitompul, 2004).

5. Glisin

Kandungan glisin tepung bulu ayam berkisar antara 2,920-6,310 %. Fermentasi tepung bulu ayam dengan *B. licheniformis* B2560 memiliki kandungan glisin paling tinggi dan berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan tepung bulu ayam yang difermentasi dengan *B. subtilis* dan tepung bulu ayam tanpa fermentasi. Hal ini diduga *B. licheniformis* B2560 lebih mampu menguraikan protein keratin bulu ayam menjadi glisin dibandingkan *B. subtilis*.

Jumlah inokulum 5 mL pada fermentasi menghasilkan kandungan glisin yang lebih tinggi dan berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan inokulum 10 dan 15 mL. Interaksi antara perlakuan menunjukkan bahwa perlakuan tepung bulu ayam yang difermentasi dengan 5 mL inokulum *B. licheniformis* B2560 (A2B1) menghasilkan kandungan glisin yang paling tinggi. Kandungan glisin dalam penelitian ini lebih tinggi dari kandungan glisin 10 contoh

tepung ikan, berkisar 2,23-4,43%, dan 10 contoh tepung kedelai, mencapai 0,40-2,90% (Sitompul, 2004).

6. Treonin

Kandungan treonin tepung bulu ayam berkisar antara 2,330-3,453 %. Fermentasi tepung bulu ayam dengan *B. licheniformis* B2560 memiliki kandungan asam amino paling tinggi dan berbeda nyata dengan tepung bulu ayam yang difermentasi dengan *B. subtilis* dan tepung bulu ayam tanpa fermentasi. Hal ini diduga *B. licheniformis* B2560 lebih mampu menguraikan protein keratin bulu ayam menjadi treonin.

Jumlah inokulum 15 mL pada fermentasi menghasilkan kandungan treonin yang lebih tinggi dan berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan inokulum 5 dan 10 mL. Interaksi antara perlakuan menunjukkan bahwa perlakuan tepung bulu ayam yang difermentasi dengan 5 mL inokulum *B. licheniformis* B2560 (A2B1) menghasilkan kandungan treonin yang relatif sama dengan yang difermentasi dengan 15 mL inokulum *B. subtilis* (A3B3) dan paling tinggi dibandingkan perlakuan lainnya. Wilson (1985) menyatakan kebutuhan treonin beberapa ikan berkisar antara 2-4%, sedangkan menurut NRC (2011), berkisar antara 0,56-1,19%. Hasil penelitian ini menunjukkan semua perlakuan memiliki kadar treonin yang sesuai dengan kebutuhan ikan. Kandungan treonin dalam penelitian ini lebih tinggi dari kandungan treonin 10 contoh tepung ikan, yaitu 1,80-2,91%, dan relatif sama dengan 10 contoh tepung kedelai, mencapai 1,08-3,95% (Sitompul, 2004).

7. Arginin

Arginin merupakan asam amino esensial yang sangat diperlukan bagi pertumbuhan optimal ikan (Chen *et al.*, 2012). Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa arginin juga berperan dalam meningkatkan respons imun ikan *Jian carp* (*Cyprinus carpio* var. Jian) (Chen *et al.*, 2015). Kandungan arginin tepung bulu ayam berkisar antara 3,390-4,620 %. Fermentasi tepung bulu ayam dengan *B. licheniformis* B2560 memiliki kandungan arginin paling tinggi dan berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan tepung bulu ayam yang difermentasi dengan *B. subtilis* dan tepung bulu ayam tanpa fermentasi. Hal ini diduga *B. licheniformis* B2560 lebih mampu menguraikan protein keratin bulu ayam menjadi arginin.

Jumlah inokulum 15 mL pada fermentasi menghasilkan kandungan arginin yang lebih tinggi dan berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan inokulum 5 dan 10 mL. Interaksi antara perlakuan menunjukkan bahwa perlakuan tepung bulu ayam yang difermentasi dengan 5 mL inokulum *B. licheniformis* B2560 (A2B1) menghasilkan kandungan arginin yang paling tinggi.

Kebutuhan kuantitatif arginin ditentukan oleh energi tercerna dan protein pakan. Kebutuhan arginin beberapa spesies ikan berbeda-beda, dan berkisar antara 3,5-6,0 % (Wilson, 1985), sedangkan menurut NRC (2011), berkisar antara 1,2-2,04%. Hasil penelitian ini telah memenuhi kebutuhan arginin beberapa jenis ikan. Arginin dalam pakan diperlukan ikan untuk sintesis protein, dan berperan dalam biosintesis urea. Arginin didistribusikan terutama dalam fraksi mitokondria, baik pada ginjal maupun hati ikan teleostei (Buwono, 2000). Kandungan arginin dalam penelitian ini lebih tinggi dari kandungan arginin 10 contoh tepung ikan, berkisar 2,10-3,81%, dan 10 contoh tepung kedelai, mencapai 0,63-3,94% (Sitompul, 2004).

8. Alanin

Kandungan alanin tepung bulu ayam berkisar antara 1,940-2,640 %. Fermentasi tepung bulu ayam dengan *B. licheniformis* B2560 memiliki kandungan alanin paling tinggi dan berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan tepung bulu ayam yang difermentasi dengan *B. subtilis*

dan tepung bulu ayam tanpa fermentasi. Hal ini diduga *B. licheniformis* B2560 lebih mampu menguraikan protein keratin bulu ayam menjadi alanin.

Jumlah inokulum 15 mL pada fermentasi menghasilkan kandungan alanin yang lebih tinggi dan berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan inokulum 5 dan 10 mL. Interaksi antara perlakuan menunjukkan bahwa perlakuan tepung bulu ayam yang difermentasi dengan 15 mL inokulum *B. licheniformis* B2560 (A2B3) menghasilkan kandungan alanin yang paling tinggi. Kandungan alanin dalam penelitian ini sedikit lebih rendah dari kandungan alanin 10 contoh tepung ikan, berkisar 2,99-4,75%, dan 10 contoh tepung kedelai, mencapai 0,50-3,17% (Sitompul, 2004).

9. Tirosin

Kandungan tirosin tepung bulu ayam berkisar antara 1,220-1,600 %. Fermentasi tepung bulu ayam dengan *B. licheniformis* B2560 memiliki kandungan tirosin paling tinggi dan berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan tepung bulu ayam yang difermentasi dengan *B. subtilis* dan tepung bulu ayam tanpa fermentasi (Tabel 4). Hal ini diduga *B. licheniformis* B2560 lebih mampu menguraikan protein keratin bulu ayam menjadi tirosin.

Tabel 4. Pengaruh fermentasi terhadap kandungan asam amino

Fermentasi	Tirosin	Metionin	Valin	Fenilalanin	Isoeusin	Leusin	Lisin
A1	1,260 ^a	0,200 ^a	3,910 ^a	2,440 ^a	2,600 ^a	3,790 ^a	0,980 ^a
A2	1,443 ^c	0,220 ^b	4,280 ^a	2,910 ^c	3,087 ^c	4,383 ^c	1,120 ^a
A3	1,383 ^b	0,223 ^b	3,428 ^a	2,807 ^b	2,920 ^b	4,203 ^b	1,605 ^a

Keterangan : angka yang diikuti huruf superscript yang berbeda menunjukkan berbeda nyata pada DMRT dengan taraf uji 5%. A1 = kontrol (non fermentasi), A2 = fermentasi dengan *B. licheniformis* B2560, A3 *B. licheniformis* B2560 = fermentasi dengan *B. subtilis*

Tabel 5 menunjukkan bahwa jumlah inokulum 5 dan 15 mL pada fermentasi menghasilkan kandungan tirosin yang lebih tinggi dan berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan inokulum 10 mL. Interaksi antara perlakuan menunjukkan bahwa perlakuan tepung bulu ayam yang difermentasi dengan 5 mL inokulum *B. licheniformis* B2560 (A2B1) menghasilkan kandungan tirosin yang paling tinggi (Tabel 6).

Tabel 5. Pengaruh jumlah inokulum terhadap kandungan asam amino

Jumlah inokulum	Tirosin	Metionin	Valin	Fenilalanin	Isoeusin	Leusin	Lisin
B1	1,360 ^b	0,237 ^b	4,037 ^a	2,623 ^b	2,817 ^b	4,033 ^b	1,167 ^a
B2	1,307 ^a	0,2033 ^a	4,057 ^a	2,607 ^a	2,723 ^a	4,003 ^a	1,003 ^a
B3	1,420 ^b	0,2033 ^a	3,525 ^a	2,927 ^c	3,067 ^c	4,340 ^c	1,535 ^a

Keterangan : angka yang diikuti huruf superscript yang berbeda menunjukkan berbeda nyata pada DMRT dengan taraf uji 5%. B1 = 5 mL inokulum, B2 = 10 mL inokulum, B3 = 15 mL inokulum

Tingkat kebutuhan ikan terhadap tirosin adalah 0,0-0,4 % dari protein pakan (Wilson, 1985). Hasil penelitian menunjukkan semua perlakuan memiliki kandungan tirosin yang lebih tinggi dari kebutuhan ikan. Namun, apabila dibandingkan dengan hasil penelitian Sitompul (2004), kandungan tirosin dalam penelitian ini lebih rendah dari kandungan tirosin 10 contoh tepung ikan, yaitu berkisar 1,01-2,60%, dan 10 contoh tepung kedelai, berkisar 1,70-2,71%.

10. Metionin

Metionin merupakan asam amino esensial yang berperan penting dalam struktur protein dan metabolisme (Martinez *et al.*, 2017). Kandungan metionin tepung bulu ayam berkisar antara 0,170-0,300 %. Fermentasi tepung bulu ayam dengan *B. licheniformis* B2560 dan *B. subtilis* memiliki kandungan metionin yang sama dan berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan non fermentasi. Jumlah inokulum 5 mL pada fermentasi menghasilkan kandungan metionin yang lebih tinggi dan berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan inokulum 10 dan 15 mL. Interaksi antara perlakuan menunjukkan bahwa perlakuan tepung bulu ayam yang difermentasi dengan 10 dan 15 mL inokulum *B. subtilis* (A3B2 & A3B3) menghasilkan kandungan metionin yang relatif sama dan paling tinggi dibandingkan perlakuan lainnya. Tingkat kebutuhan ikan terhadap metionin adalah 2,3-4,0 % dari protein pakan (Wilson, 1985), sedangkan menurut NRC (2011), berkisar antara 0,64-1,36%. Ma *et al.* (2013) melaporkan bahwa metionin yang diperlukan oleh juvenil ikan turbot sebesar 1,58%.

Tabel 6. Pengaruh fermentasi dan jumlah inokulum terhadap kandungan asam amino

Interaksi Perlakuan	Tirosin	Metionin	Valin	Fenilalanin	Isoeusin	Leusin	Lisin
Kontrol	1,260 ^b	0,200 ^{bc}	3,910 ^b	2,440 ^b	2,600 ^b	3,790 ^b	0,980 ^c
A2B1	1,600 ^c	0,300 ^c	4,380 ^e	3,090 ^e	3,330 ^d	4,640 ^e	1,580 ^f
A2B2	1,230 ^a	0,170 ^a	4,030 ^c	2,480 ^c	2,600 ^b	3,790 ^b	0,930 ^b
A2B3	1,500 ^d	0,190 ^{ab}	4,430 ^f	3,160 ^f	3,330 ^d	4,720 ^f	0,850 ^a
A3B1	1,220 ^a	0,210 ^{bc}	3,820 ^a	2,340 ^a	2,520 ^a	3,670 ^a	0,940 ^b
A3B2	1,430 ^c	0,240 ^d	4,230 ^d	2,900 ^d	2,970 ^c	4,430 ^c	1,100 ^e
A3B3	1,500 ^d	0,220 ^{cd}	4,240 ^d	3,180 ^e	3,300 ^d	4,510 ^d	1,050 ^d

Keterangan : angka yang diikuti huruf superscript yang berbeda menunjukkan berbeda nyata pada DMRT dengan taraf uji 5%. A1 = kontrol (non fermentasi), A2 = fermentasi dengan *B. licheniformis* B2560, A3 = fermentasi dengan *B. subtilis*, B1 = 5 mL inokulum, B2 = 10 mL inokulum, B3 = 15 mL inokulum.

Hasil penelitian menunjukkan semua perlakuan memiliki kandungan metionin lebih rendah dari kebutuhan ikan. Kandungan metionin dalam penelitian ini lebih rendah dari kandungan metionin 10 contoh tepung ikan, berkisar 0,99-2,71%, dan 10 contoh tepung kedelai, mencapai 0,70-2,51% (Sitompul, 2004).

11. Valin

Kandungan valin tepung bulu ayam berkisar antara 3,820-4,430 %. Perlakuan fermentasi maupun non fermentasi (kontrol) menghasilkan kandungan valin yang relatif sama ($P > 0,05$). Demikian juga, penggunaan jumlah inokulum yang berbeda, menghasilkan kadar valin yang sama pula ($P > 0,05$). Namun, interaksi antara perlakuan menunjukkan bahwa perlakuan tepung bulu ayam yang difermentasi dengan 15 mL inokulum *B. licheniformis* B2560 (A2B3) menghasilkan kandungan valin yang paling tinggi dan berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan interaksi antara perlakuan lainnya. Tingkat kebutuhan ikan terhadap valin adalah 3,0-4,0 % dari protein pakan (Wilson, 1985), sedangkan menurut NRC (2011), berkisar antara 0,78-1,20%. Hasil penelitian menunjukkan semua perlakuan memiliki kandungan valin yang memenuhi syarat bagi pakan ikan. Kandungan valin dalam penelitian ini lebih tinggi dari kandungan valin 10 contoh tepung ikan, berkisar 1,34-3,47%, dan 10 contoh tepung kedelai, mencapai 0,20-3,47% (Sitompul, 2004).

12. Fenilalanin

Kandungan fenilalanin tepung bulu ayam berkisar antara 2,340-3,180 %. Fermentasi tepung bulu ayam dengan *B. licheniformis* B2560 memiliki kandungan fenilalanin paling tinggi dan berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan tepung bulu ayam yang difermentasi dengan *B. subtilis* dan tepung bulu ayam tanpa fermentasi. Hal ini diduga *B. licheniformis* B2560 lebih mampu menguraikan protein keratin bulu ayam menjadi fenilalanin.

Jumlah inokulum 15 mL pada fermentasi menghasilkan kandungan fenilalanin yang lebih tinggi dan berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan inokulum 5 dan 10 mL. Interaksi antara perlakuan menunjukkan bahwa perlakuan tepung bulu ayam yang difermentasi dengan 15 mL inokulum *B. subtilis* (A3B3) menghasilkan kandungan fenilalanin yang paling tinggi. Hasil penelitian menunjukkan semua perlakuan memiliki kandungan fenilalanin yang sesuai dengan kebutuhan ikan, sesuai dengan NRC (2011), kebutuhan ikan terhadap fenilalanin berkisar antara 1,40-1,98%, meskipun menurut Wilson (1985), tingkat kebutuhan ikan terhadap fenilalanin adalah 5,0-6,5 % dari protein pakan. Namun, kandungan fenilalanin dalam penelitian ini lebih tinggi dari kandungan fenilalanin 10 contoh tepung ikan, berkisar 1,81-2,99%, dan 10 contoh tepung kedelai, mencapai 2,10-2,92% (Sitompul, 2004).

13. Isoleusin

Kandungan isoleusin tepung bulu ayam berkisar antara 2,520-3,330 %. Fermentasi tepung bulu ayam dengan *B. licheniformis* B2560 memiliki kandungan isoleusin paling tinggi dan berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan tepung bulu ayam yang difermentasi dengan *B. subtilis* dan tepung bulu ayam tanpa fermentasi. Hal ini diduga *B. licheniformis* B2560 lebih mampu menguraikan protein keratin bulu ayam menjadi isoleusin.

Jumlah inokulum 15 mL pada fermentasi menghasilkan kandungan isoleusin yang lebih tinggi dan berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan inokulum 5 dan 10 mL. Interaksi antara perlakuan menunjukkan bahwa perlakuan tepung bulu ayam yang difermentasi dengan 5 dan 15 mL inokulum *B. licheniformis* B2560 (A2B1 & A2B3) serta 15 mL inokulum *B. subtilis* (A3B3) menghasilkan kandungan isoleusin yang paling tinggi. Tingkat kebutuhan ikan terhadap isoleusin adalah 2,2-4,0 % dari protein pakan (Wilson, 1985), sedangkan menurut NRC (2011), berkisar antara 0,73-0,90%. Hasil penelitian semua perlakuan memiliki kandungan isoleusin yang memenuhi syarat bagi pakan ikan. Kandungan isoleusin dalam penelitian ini lebih tinggi dari kandungan isoleusin 10 contoh tepung ikan, berkisar 1,61-2,61%, dan 10 contoh tepung kedelai, mencapai 0,93-3,01% (Sitompul, 2004).

14. Leusin

Kandungan leusin tepung bulu ayam berkisar antara 3,670-4,720 %. Fermentasi tepung bulu ayam dengan *B. licheniformis* B2560 memiliki kandungan leusin paling tinggi dan berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan tepung bulu ayam yang difermentasi dengan *B. subtilis* dan tepung bulu ayam tanpa fermentasi. Hal ini diduga *B. licheniformis* B2560 lebih mampu menguraikan protein keratin bulu ayam menjadi leusin.

Jumlah inokulum 15 mL pada fermentasi menghasilkan kandungan leusin yang lebih tinggi dan berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan inokulum 5 dan 10 mL. Interaksi antara perlakuan menunjukkan bahwa perlakuan tepung bulu ayam yang difermentasi dengan 15 mL inokulum *B. licheniformis* B2560 (A2B3) menghasilkan kandungan leusin yang paling tinggi dan berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan interaksi antara perlakuan lainnya. Tingkat kebutuhan ikan terhadap leusin adalah 3,3-5,3 % dari protein pakan (Wilson, 1985), sedangkan menurut NRC (2011), berkisar antara 0,95-1,4%. Hasil penelitian menunjukkan

semua perlakuan memiliki kandungan leusin yang memenuhi syarat bagi pakan ikan. Kandungan leusin dalam penelitian ini lebih tinggi dari kandungan leusin 10 contoh tepung ikan, berkisar 2,78-4,03%, dan 10 contoh tepung kedelai, mencapai 0,61-3,70% (Sitompul, 2004).

15. Lysin

Kandungan lysin tepung bulu ayam berkisar antara 0,850-1,580 %. Perlakuan fermentasi maupun non fermentasi (kontrol) menghasilkan kandungan lysin yang relatif sama. Demikian juga, penggunaan jumlah inokulum yang berbeda, menghasilkan kadar lysin yang sama pula. Namun, interaksi antara perlakuan menunjukkan bahwa perlakuan tepung bulu ayam yang difermentasi dengan 5 ml inokulum *B. licheniformis* B2560 (A2B1) menghasilkan kandungan lysin yang paling tinggi dan berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan interaksi antara perlakuan lainnya. Tingkat kebutuhan ikan terhadap lysin adalah 3,7-5,7 % dari protein pakan (Wilson, 1985), sedangkan menurut NRC (2011), berkisar antara 1,43-1,80%. Kandungan lysin tepung bulu ayam belum memenuhi kandungan lysin yang dibutuhkan ikan. Kandungan lysin dalam penelitian ini lebih rendah dari kandungan lysin 10 contoh tepung ikan, berkisar 2,71-5,75%, dan 10 contoh tepung kedelai, mencapai 1,17-2,91% (Sitompul, 2004).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa *B. licheniformis* B2560 lebih mampu menguraikan protein keratin dengan baik dibandingkan *B. subtilis*. Hal ini terlihat dari kandungan asam amino yang dihasilkan oleh perlakuan yang difermentasi dengan *B. licheniformis* B2560, meskipun ada beberapa jenis asam amino yang lebih tinggi setelah difermentasi dengan *B. subtilis*. *B. licheniformis* mampu memproduksi enzim keratinase dalam jumlah yang tinggi (Brandelli, 2008). Keratinase memiliki kemampuan yang sangat baik dalam menurunkan kadar keratin melalui perombakan struktur jaringan kimia dinding sel, pemutusan ikatan hidrogen, dan ikatan disulfida penyusun keratin. Ikatan disulfida antar asam amino sistein menyebabkan protein bulu ayam sulit dicerna oleh enzim proteolitik dalam saluran pencernaan sehingga ikatan disulfida harus dilepaskan melalui hidrolisis oleh mikroba (Rodriguez *et al.*, 2009). Aktivitas keratinase selama proses hidrolisis tepung bulu ayam akan memecah keratin menjadi pepton dan memutus ikatan S-S pada sistin menjadi sistein (Sonjaya, 2001). Hal tersebut menyebabkan ikatan-ikatan antar asam amino pada keratin penyusun bulu ayam terputus sehingga mempermudah penetrasi enzim dan meningkatkan fraksi protein.

Jumlah inokulum bakteri yang digunakan untuk fermentasi juga mempengaruhi kandungan asam amino yang dihasilkan. Dalam penelitian ini, jumlah inokulum 15 ml lebih optimal dalam mendegradasi protein keratin menjadi asam amino. Hal ini diduga semakin banyak bakteri, maka enzim yang dihasilkan oleh bakteri semakin banyak. Kerja enzim salah satunya dipengaruhi oleh konsentrasi enzim (Williams & Wilson, 2005).

KESIMPULAN

Fermentasi tepung bulu ayam menggunakan *B. licheniformis* B2560 dapat meningkatkan kandungan beberapa jenis asam amino lebih tinggi dibandingkan dengan *B. subtilis*. Jumlah inokulum 15 mL lebih optimal dalam mendegradasi protein keratin menjadi asam amino. Jenis asam amino dengan kandungan yang sesuai untuk kebutuhan ikan adalah asam glutamat, serin, glisin, treonin, arginin, tirosin, valin, fenilalanin, isoleusin, dan leusin.

DAFTAR PUSTAKA

- Abubakar, Triyantini, Setyanto, H., Supriyati, Sugiarto, and Wahyudi, M. (2000) Survey potensi ketersediaan bulu ayam, cara pengolahan dan pemotongan ternak ayam di TPA. *Laporan Penelitian T.A.* 1999/2000. Balai Penelitian Ternak. Bogor.
- Achmad, W. (2001). Potensi limbah agroindustri sebagai pakan sapi perah. *Skripsi.* Fakultas Peternakan. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Badan Pusat Statistik. (2020a). *Peternakan*. BPS. Jakarta. www.bps.go.id. Diakses pada tanggal 30 Oktober 2021.
- Badan Pusat Statistik. (2020b). *Konsumsi dan Pengeluaran*. BPS. Jakarta. www.bps.go.id. Diakses pada tanggal 30 Oktober 2021.
- Brandelli, A. (2008). ‘Bacterial keratinases: useful enzymes for bioprocessing agroindustrial wastes and beyond’, *Food Bioprocess Technol.*, 1, pp. 105-116.
- Buwono, I.D. (2000). *Kebutuhan Asam Amino Esensial Dalam Ransum Ikan*. Yogyakarta: Kanisius.
- Chen, G., Feng, L., Kuang, S., Liu, Y., Jiang, J., Hu, K., Jiang, W., Li, S., Tang, L., and Zhou, X. (2012) ‘Effect of dietary arginine on growth, intestinal enzyme activities and gene expression in muscle, hepatopancreas and intestine of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian)’, *Br. J. Nutr.*, 108, pp 195-207
- Chen, G., Liu, Y., Jiang, J., Jiang, W., Kuang, S., Tang, L., Tang, W., Zhang, Y., Zhou, X., and Feng, L. (2015) ‘Effect of dietary arginine on the immune response and gene expression in head kidney and spleen following infection of Jian carp Q3 with *Aeromonas hydrophila*’, *Fish & Shellfish Immunology*, pp 1-8.
- Craig, S. (2017). ‘Understanding Fish Nutrition, Feeds, and Feeding’, *Virginia Tech*, 420-256, pp. 1-6.
- Joshi. S. G., Tejashwini, M. M., Revati, N., Sridevi, R. and Roma, D. (2007). Isolation, Identification and Characterization of Feather Degrading Bacterium. *International Journal of Poultry Science*, 6(9), pp. 689-693.
- Kim W.K. and Patterson, P.H. (2000) ‘Nutritional Value of Enzyme or Sodium Hydroxide-Treated Feathers from Dead Hens’, *Poultry Sci.*, 79, pp. 528–534.
- Ma, R., Hou, H., Mai, K., Bharadwaj, A.S., Cao, H., Ji, F., and Zhang, W. (2013). ‘Comparative study on the effects of L-methionine or 2-hydroxy-4-(methylthio) butanoic acid as dietary methionine source on growth performance and anti-oxidative responses of turbot (*Psetta maxima*)’, *Aquaculture*, 412, pp. 136-143
- Madigan, M. (2005). Brock Biology of Microorganisms (11th ed.). Martinko J (editors). *International Microbiology*, 8(2), pp. 149-150.
- Martínez, Y., Li, X., Liu, G., Bin, P., Yan, W., Más, D., Valdiviá, M., Hu, CA., Ren, W., and Yin, Y. (2017) ‘The role of methionine on metabolism, oxidative stress, and diseases’, *Amino acids*, 49, pp. 2091-2098
- Mazotto, A. M., R. R. Coelho, S. M. Cedrola, M. F. De Lima, S. Couri, S. E. de Paraguai and A. B. Vermelho. (2011) ‘Keratinase production by three *Bacillus* spp. using feather meal and whole feather as substrate in a submerged Fermentation’, *Research Article, Enzyme Research*. Brazil
- Mulia, D.S., Maryanto, H. and Purbomartono, C. (2013). Pengembangan Pakan Bervaksin (dengan Memanfaatkan Limbah Lokal Sebagai Bahan Baku dan Vaksin *Aeromonas hydrophila*) Pada Budidaya Lele Dumbo. *Laporan Penelitian*

- Unggulan Perguruan Tinggi Tahun ke-1*. Universitas Muhammadiyah Purwokerto. Purwokerto.
- Mulia, D.S., Nartanti, Y., Maryanto, H. and Purbomartono, C. (2014). 'Fermentasi tepung bulu ayam dengan *Bacillus licheniformis* B 2560 untuk meningkatkan kualitas bahan baku pakan ikan', *Seminar Nasional XI Biologi, Sains, Lingkungan, dan Pembelajarannya*. Prodi Pendidikan Biologi FKIP Universitas Sebelas Maret, Surakarta.
- Mulia, D.S., Yuliningsih, R.T., Maryanto, H., and Purbomartono, C. (2016) 'Pemanfaatan limbah bulu ayam menjadi bahan pakan ikan dengan fermentasi *Bacillus subtilis*', *Jurnal Manusia dan Lingkungan*, 23(1), pp. 49-57.
- National Research Council (NRC). (2011). *Nutrient Requirements of Fish and Shrimp*. Washington D.C.: National Academic Press.
- Puastuti, W., D. Yulistiani, D., and Mathius, I.W. (2004) 'Bulu ayam yang diproses secara kimia sebagai sumber protein *bypass* rumen', *JITV.*, 9(2). pp. 73-80.
- Rodriguez, M.R., Valdivia, E., Soler, J.J., Vivaldi, M.M., Martin-Platero, A.M., and Martinez-Bueno, M. (2009) 'Symbiotic bacteria living in the hoopoe's uropygial gland prevent feather degradation', *The Journal of Experimental Biology*, 212, pp. 3621-3626.
- Sa'adah, N., Hastuti, R., and Prasetya, N.B.A. (2013) 'Pengaruh asam formiat pada bulu ayam sebagai adsorben terhadap penurunan kadar larutan zat warna tekstil *remazon golden yellow RNL*', *Jurnal Kimia Universitas Diponegoro*, 1(1), pp. 202-209.
- Sinoy, T., Bhausahab, C.P., and Rajendra, P.P. (2011). Isolation and identification of feather degradable microorganism. *VSRD-TNTJ.*, 2(3), pp. 128-136.
- Sitompul, S. (2004) 'Analisis asam amino dalam tepung ikan dan bungkil kedelai', *Buletin Teknik Pertanian*, 9(1), pp. 33-37.
- Sonjaya, T. (2001). Nilai retensi nitrogen dan kandungan energi metabolis tepung bulu ayam yang mendapat perlakuan kimiawi, biologis, dan enzimatis. *Skripsi*. Jurusan Ilmu Nutrisi dan Makanan Ternak Fakultas Peternakan. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Subandiyono and Hastuti, S. (2009). *Nutrisi Ikan*. Buku Ajar. Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro, Semarang.
- Supriyati, Purwadinata, T. and Kompiang, I.P. (2000). 'Produksi mikroba terseleksi pemecah keratin pada bulu ayam skala laboratorium', *Seminar Nasional Peternakan dan Veteriner 2000*. Balai Penelitian Ternak. Bogor.
- Tiwarly, E. and Gupta, R. (2012). 'Rapid conversion of chicken feather to feather meal using dimeric keratinase from *Bacillus licheniformis* ER-15', *J. Bioprocess Biotechniq*, 2,4.
- Williams, B. and & Wilson, K. (2005). *Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology. Sixth Edition*. New York: Cambridge University Press.
- Wilson, R.P. (1985). *Amino Acids and Protein Requirements of Fish*. London: Academic Press.
- Zerdani, I., Faid, M., And Malki, A. (2004) 'Feather wastes digestion by new isolated strains *Bacillus* sp. in marocco', *African J. Biotech.*, 3(1), pp.: 67-70.