



**HIDROLISIS PROTEIN IKAN LEMURU (*Sardinella sp.*)
MENGUNAKAN EKSTRAK KASAR PROTEASE
DARI ISI PERUT IKAN *SKIPJACK* TUNA
(*Katsuwonus pelamis*)**

Asal :	Hadiah	Klass 542.4 R12 h c-1
Periode :	Periode	
SKRIPSI	08 OCT 2008	
Peng Katalog :	kup	

Diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Jurusan Kimia (S1)
dan mencapai gelar Sarjana Sains

Oleh

Agustian Fathor Rizal
NIM 031810301104

**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2008**

PERSEMBAHAN

- Bapak dan Ibu yang telah memberikan kasih sayang dan pengorbanannya yang tak terhingga, yang selalu mendukungku untuk selalu menjadi yang terbaik, terima kasih atas doa-doa bapak dan ibu, karena berkat doa itulah, banyak impianku yang menjadi kenyataan. *Mom, I love you so much, no one else likes you. You are the best for me.*
- Untuk mas dan mbakku serta keponakan-keponakanku yang selalu mendukung aku, terima kasih untuk semuanya.
- Untuk semua guru-guru yang telah mengajar aku dari TK sampai Perguruan tinggi, terima kasih atas ilmu yang telah diberikan.
- Untuk partner kerja labku, Andy S dan Ribut A. P serta mas Egie T. J, terima kasih yang tak terhingga untuk semua kerjasama dan bantuannya.
- Untuk temen-temen 2003 Atik R, Bayu L. M, Vivi A, Mey L. W, Dian Y. I, Miftah A. H, Anastasia A. W, Yuzkil F. M, Vina I. P, Meta H. W, Dita J. C, W. D. Ayu, Riska O, Esti H, Laode M. D, Sumardiono, S. Intamaroh, Laras K, Lilik T dan semua temen-temen 2003 yang tidak bisa aku sebutin satu-persatu terima kasih atas semua kebersamaan, kebaikan dan keceriaan kalian selama ini. *You are the best friends for me.*
- Untuk mas Naqib, terima kasih atas bantuannya selama berada di lab.
- Untuk semua teman-teman angkatan 2004 (terutama Rara, Novi dan Irma), 2005, 2006, terima kasih atas semuanya.
- Untuk semua teman-teman kost Toba III/2, khususnya Jepri B. P, Tamam A. F, Bastian N dan Mahmud A. Y, terima kasih atas bantuan dan dukungan dalam penyelesaian skripsi ini.

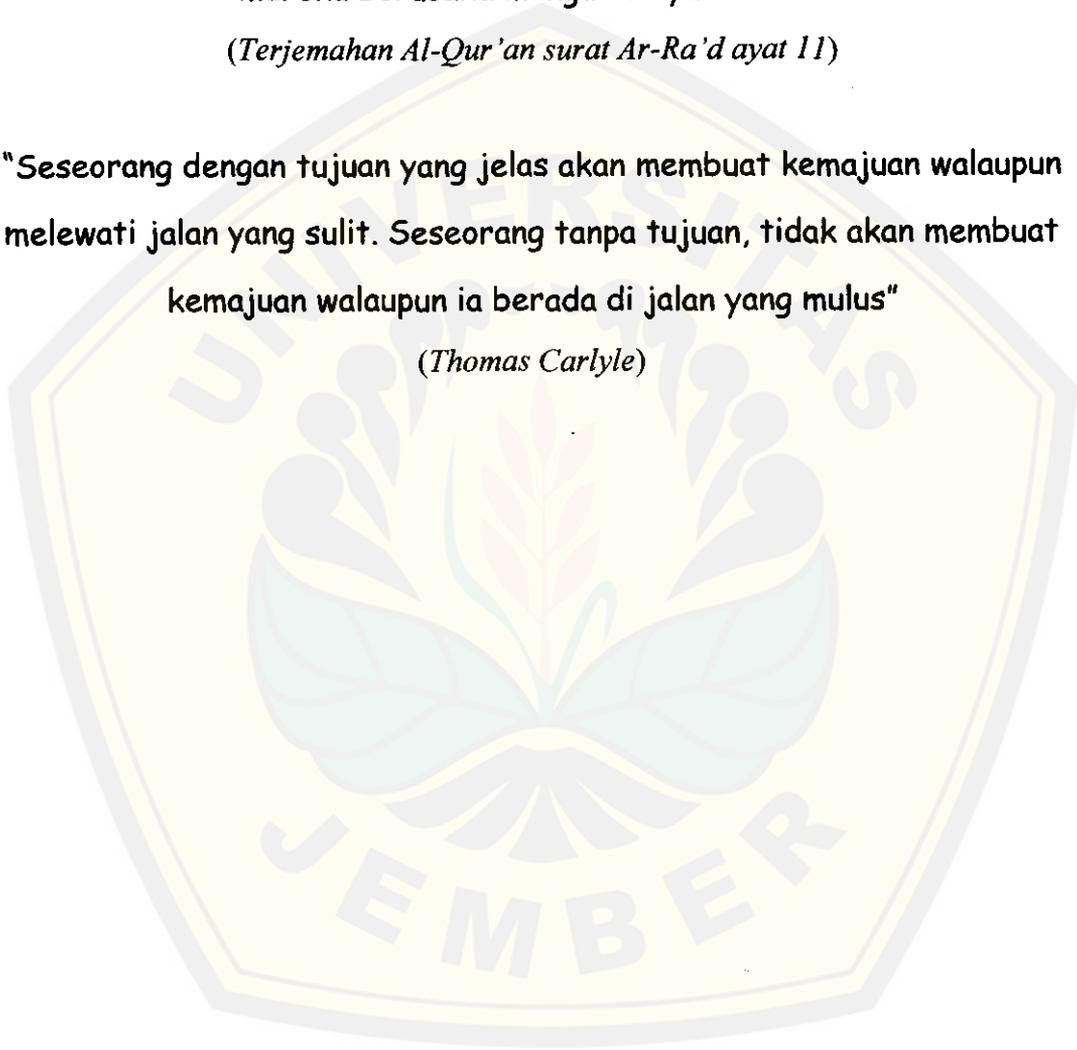
MOTTO

"Sesungguhnya Allah SWT tidak akan mengubah nasib suatu kaum hingga mereka berusaha mengubahnya sendiri"

(Terjemahan Al-Qur'an surat Ar-Ra'd ayat 11)

"Seseorang dengan tujuan yang jelas akan membuat kemajuan walaupun melewati jalan yang sulit. Seseorang tanpa tujuan, tidak akan membuat kemajuan walaupun ia berada di jalan yang mulus"

(Thomas Carlyle)



PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Agustian Fathor Rizal

NIM : 031810301104

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya tulis ilmiah yang berjudul: *Hidrolisis Protein Ikan Lemuru (Sardinella Sp.) Menggunakan Ekstrak Kasar Protease dari Isi Perut Ikan Skipjack Tuna (Katsuwonus pelamis)* adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggungjawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 27 Juni 2008

Yang menyatakan,



Agustian Fathor Rizal
NIM 031810301104

SKRIPSI

**HIDROLISIS PROTEIN IKAN LEMURU (*Sardinella sp.*)
MENGUNAKAN EKSTRAK KASAR PROTEASE
DARI ISI PERUT IKAN SKIPJACK TUNA
(*Katsuwonus pelamis*)**



Oleh

Agustian Fathor Rizal
NIM 031810301104

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Drs. Achmad Sjaifullah, M.Sc, Ph.D

Dosen Pembimbing Aanggota : Agung Budi Santoso, S.Si, M.Si

PENGESAHAN

Skripsi berjudul *Hidrolisis Protein Ikan Lemuru (Sardinella sp.) Menggunakan Ekstrak Kasar Protease dari Isi Perut Ikan Skipjack Tuna (Katsuwonus pelamis)* telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember Pada:

Hari : **RABU**
Tanggal : **.09 JUL 2008**
Tempat : Jurusan Kimia FMIPA Universitas Jember.

Tim Penguji

Ketua
(Dosen Pembimbing Utama)

Drs. Achmad Sjaifullah, M.Sc, Ph.D
NIP 131 592 358

Sekretaris
(Dosen Pembimbing Anggota)

Agung Budi Santoso, S.Si, M.Si
NIP 132 207 812

Anggota I

A.A. Istri Ratnadewi, S.Si, M.Si
NIP 132 162 523

Anggota II

drh. Wuryanti Handayani, M.Si
NIP 131 459 744



Mengesahkan
Dekan,

Prof. Kusno, D.E.A, Ph.D
NIP 131592357

RINGKASAN

Hidrolisis Protein Ikan Lemuru (*Sardinella Sp.*) Menggunakan Ekstrak Kasar Protease dari Isi Perut Ikan *Skipjack* Tuna (*Katsuwonus Pelamis*); Agustian Fathor Rizal, 031810301104; 2008: 59 halaman; Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Ikan lemuru merupakan produk perikanan terbesar di Jawa Timur dengan jumlah 153.985 ton (tahun 1998) yang terus meningkat setiap tahunnya. Dilain pihak, harga jual ikan lemuru semakin menurun. Pengolahan ikan secara enzimatik merupakan salah satu cara untuk meningkatkan nilai ekonomis dari ikan lemuru, yaitu dimanfaatkan sebagai hidrolisat protein ikan (HPI).

Isi perut ikan *skipjack* tuna merupakan sumber protease yang mudah dan murah untuk digunakan dalam industri HPI. Isi perut ikan tuna sangat potensial digunakan sebagai sumber protease dalam industri HPI, karena dalam perut ikan terdapat organ pencernaan tempat protein dihidrolisis yang mengandung banyak protease. Selain itu, isi perut ikan *skipjack* tuna merupakan limbah dari industri pengalengan ikan yang memiliki nilai ekonomis yang rendah.

Tahapan dalam penelitian ini meliputi isolasi protease dari ikan *skip jack* tuna, penentuan kadar protein ekstrak kasar protease, penentuan aktivitas total protease pada pH dan suhu optimum, hidrolisis ikan lemuru, penentuan derajat hidrolisis (%DH) dan elektroforesis HPI lemuru.

Protease dalam penelitian ini diperoleh dari isi perut ikan *skipjack* tuna pada bagian usus dan lambung. Protease dapat diperoleh melalui proses penghancuran jaringan sampel dengan blender dan proses pemisahan dengan sentrifuge.

Penentuan kadar protein dari ekstrak kasar protease diperlukan untuk mengetahui aktivitas spesifik dari ekstrak kasar protease. Kadar protein ekstrak kasar protease dapat diketahui dengan menentukan N-nya menggunakan metode Kjedahl.

Kadar protein dalam ekstrak kasar protease dari isi perut ikan *skipjack* tuna sebesar 5.5 mg/mL.

Uji optimasi pH menggunakan variasi pH 1 hingga 12 pada suhu 50°C. Hasil optimasi pH didapatkan aktivitas spesifik optimum ekstrak kasar protease pada pH 2 yaitu sebesar 30,5 unit/mg dan pada pH 8 sebesar 24,1 unit/mg. Suhu optimum pada pH 2 diperoleh pada suhu 40°C dengan aktivitas spesifik sebesar 5,495 unit/mg. Sedangkan pada pH 8 juga diperoleh pada suhu 40°C dengan aktivitas spesifik sebesar 10,430 unit/mg.

Derajat Hidrolisis (%DH) merupakan persentase yang menyatakan tingkat pemotongan peptida dalam hidrolisis protein, baik oleh asam, basa ataupun enzim protease. DH protein ikan lemuru yang diinkubasi pada pH 2 dan pH 8 dengan suhu 40°C dengan variasi waktu inkubasi 5, 30, 60, 120 dan 180 menit didapatkan nilai %DH yang meningkat seiring dengan bertambahnya waktu inkubasi. Derajat hidrolisis pada pH 2 terjadi peningkatan secara perlahan dan pada pH 8 terjadi peningkatan secara drastis.

Dari elektroforegram hasil hidrolisis pada pH 2 dan pH 8 didapatkan perbedaan pita-pita protein pada masing-masing sampel dengan variasi waktu inkubasi. Hal ini mengindikasikan terjadinya pemotongan protein ikan lemuru. Namun, hasil SDS-PAGE ini belum bisa menggambarkan profil peptida yang sesuai dengan nilai %DH yang dilakukan berdasarkan metode formol.

PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT, yang telah melimpahkan nikmat, rahmat, taufiq dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini yang berjudul *Hidrolisis Protein Ikan Lemuru (Sardinella Sp.) Menggunakan Ekstrak Kasar Protease dari Isi Perut Ikan Skipjack Tuna (Katsuwonus pelamis)*. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada jurusan kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

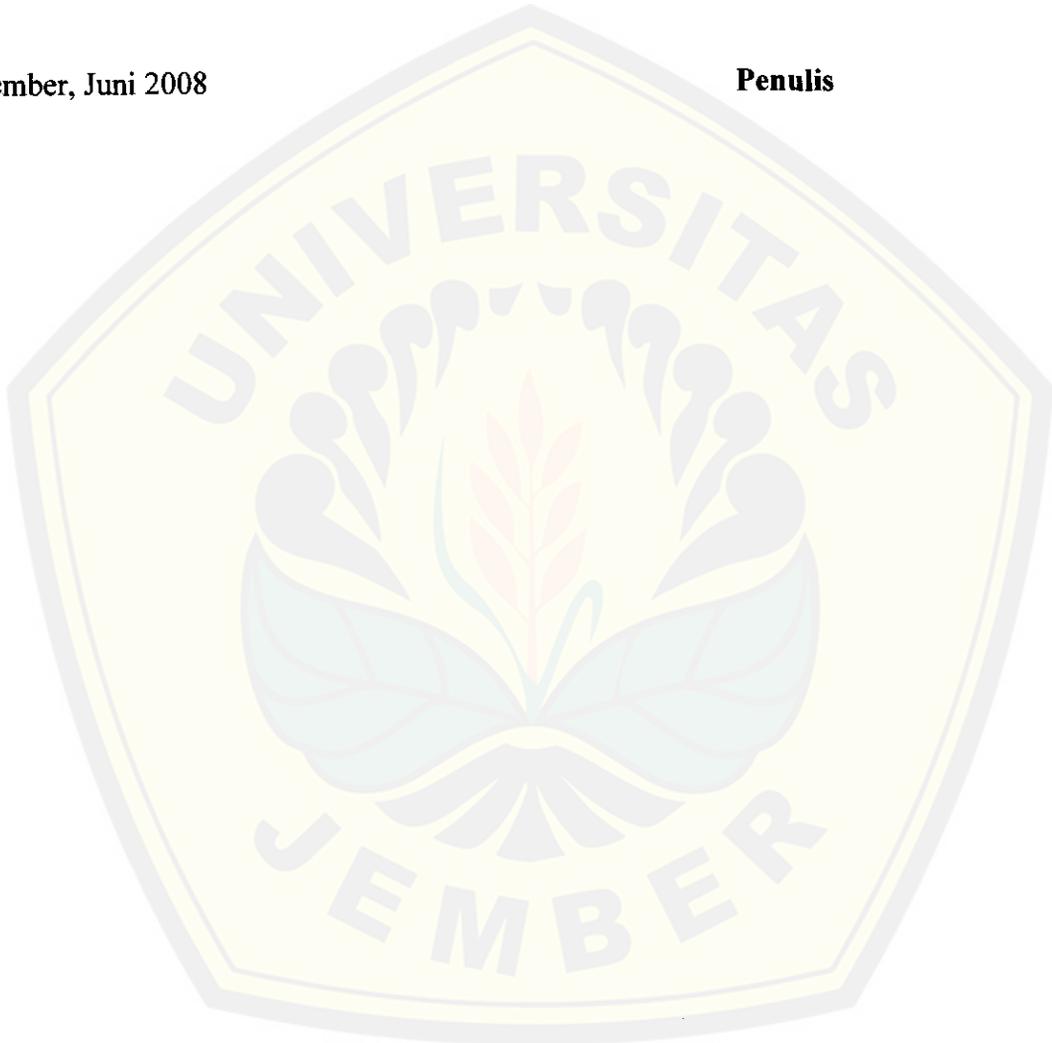
Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. Prof. Drs. Kusno, D.E.A, Ph.D., selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember;
2. Drs. Siswoyo, M.Si, Ph.D., selaku Ketua Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember;
3. Drs. Achmad Sjaifullah, M.Sc, Ph.D., selaku Dosen Pembimbing Utama, Agung Budi Santoso, S.Si, M.Si., selaku Dosen Pembimbing Anggota, A. A. Istri Ratnadewi, S.Si, M.Si., selaku Dosen Penguji I dan drh. Wuryanti Handayani, M.Si., selaku Dosen Penguji II, yang telah memberikan semangat, bimbingan, kritik, koreksi dan rekomendasi demi terselesaikannya penyusunan skripsi ini;
4. Suwardiyanto, S.Si, M.Si., selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah memberikan bimbingan dan arahan selama kuliah;
5. Seluruh Dosen Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam yang telah memberikan ilmunya selama ini;
6. Budi Hartono dan Sri Hartatik, selaku staf akademik dan staf keuangan jurusan kimia;
7. Setiadi Darma Putra, S.E., dan Dulkolim, selaku teknisi laboratorium Organik, laboratorium Biokimia dan laboratorium Instrumentasi;
8. Seluruh staf dan teknisi jurusan kimia.

Penulis menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Penulis berharap skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi penulis khususnya dan para pembaca umumnya.

Jember, Juni 2008

Penulis



DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
HALAMAN PEMBIMBINGAN	v
HALAMAN PENGESAHAN	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB 1. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	3
1.3 Batasan Masalah	4
1.4 Tujuan Penelitian	4
1.5 Manfaat Penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Ikan Skipjack Tuna (<i>Katsuwonus pelamis</i>)	6
2.2 Ikan lemuru (<i>Sardinella</i> sp.)	7
2.3 Protein	9
2.3.1 Asam Amino	11
2.3.2 Karakteristik Protein Ikan	12
2.3.3 Hidrolisat Protein Ikan (HPI)	14

2.3.4 Hidrolisis Protein	15
a. Hidrolisis Asam/Basa.....	15
b. Hidrolisis Enzimatis.....	16
2.4 Enzim	17
2.4.1 Mekanisme Katalisis Enzim	17
2.4.2 Aktivitas Enzim	18
2.5 Enzim Proteolitik (Protease).....	19
2.5.1 Protease serin	20
2.5.2 Protease Sulfhidril (Protease Thiol, Protease Sistein)	20
2.5.3 Protease Logam (Metalloprotease)	20
2.5.4 Protease Asam (Aspartil Protease, Karboksil Protease)	21
a. Pepsin	21
b. Tripsin.....	23
c. Kimotripsin	24
2.6 Derajat Hidrolisis.....	26
2.7 Elektroforesis.....	26

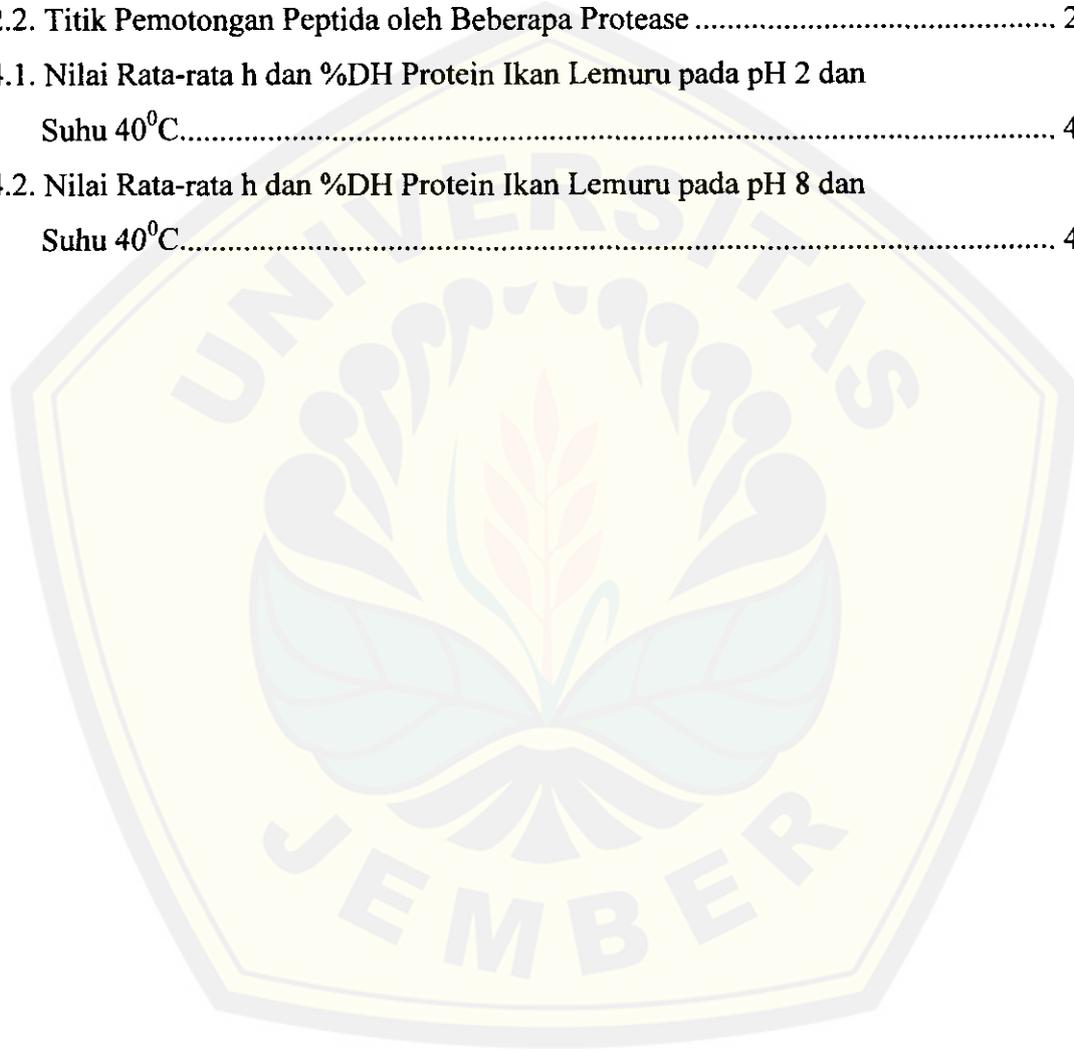
BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Pelaksanaan	28
3.2 Sampel Penelitian.....	28
3.3 Alat dan Bahan.....	28
3.4 Rancangan Penelitian	29
3.5 Prosedur Penelitian	
3.5.1 Isolasi Protease dari Ikan <i>Skipjack</i> Tuna (<i>Katsuwonus Pelamis</i>)	30
3.5.2 Penentuan Kadar Protein Ekstrak Kasar Protease	30
3.5.3 Penentuan Aktivitas Total Protease	30
3.5.4 Hidrolisis Ikan Lemuru.....	31
3.5.5 Penentuan Derajat Hidrolisis (%DH).....	32

a. Penentuan Ikatan Peptida Terhidrolisis, h	32
b. Penentuan Ikatan Peptida Total Protein, h_{tot}	32
3.5.6 Elektrofosis HPI Lemuru.....	33
3.6 Metode Analisis Data.....	34
 BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	
4. 1. Ekstrak Kasar Protease dari Isi Perut Ikan	
<i>Skipjack Tuna</i>	35
4.2 Kadar Protein Ekstrak Kasar Protease.....	37
4.3 Aktivitas Spesifik Ekstrak Kasar Protease pada Variasi pH.....	38
4.4 Aktivitas Spesifik Ekstrak Kasar Protease pada Variasi Suhu.....	41
4.5 Hidrolisis Protein Ikan Lemuru Menggunakan Ekstrak Kasar	
Protease.....	43
4.6 Derajat Hidrolisis HPI Lemuru.....	45
4.6.1 Derajat Hidrolisis HPI Lemuru, Hidrolisis Pada pH 2, 40°C.....	46
4.6.2 Derajat Hidrolisis HPI Lemuru, Hidrolisis Pada pH 8, 40°C.....	47
4.7 Elektrofogram Hasil Hidrolisis Protein Ikan Lemuru oleh	
Ekstrak Kasar Protease Ikan <i>Skipjack Tuna</i>.....	49
 BAB 5. PENUTUP	
5.1 Kesimpulan.....	54
5.2 Saran.....	54
 DAFTAR PUSTAKA.....	55
Lampiran.....	60

DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1. Komposisi Kimia Lemuru tiap 100 gram	9
2.2. Titik Pemotongan Peptida oleh Beberapa Protease	22
4.1. Nilai Rata-rata h dan %DH Protein Ikan Lemuru pada pH 2 dan Suhu 40 ⁰ C.....	46
4.2. Nilai Rata-rata h dan %DH Protein Ikan Lemuru pada pH 8 dan Suhu 40 ⁰ C.....	48

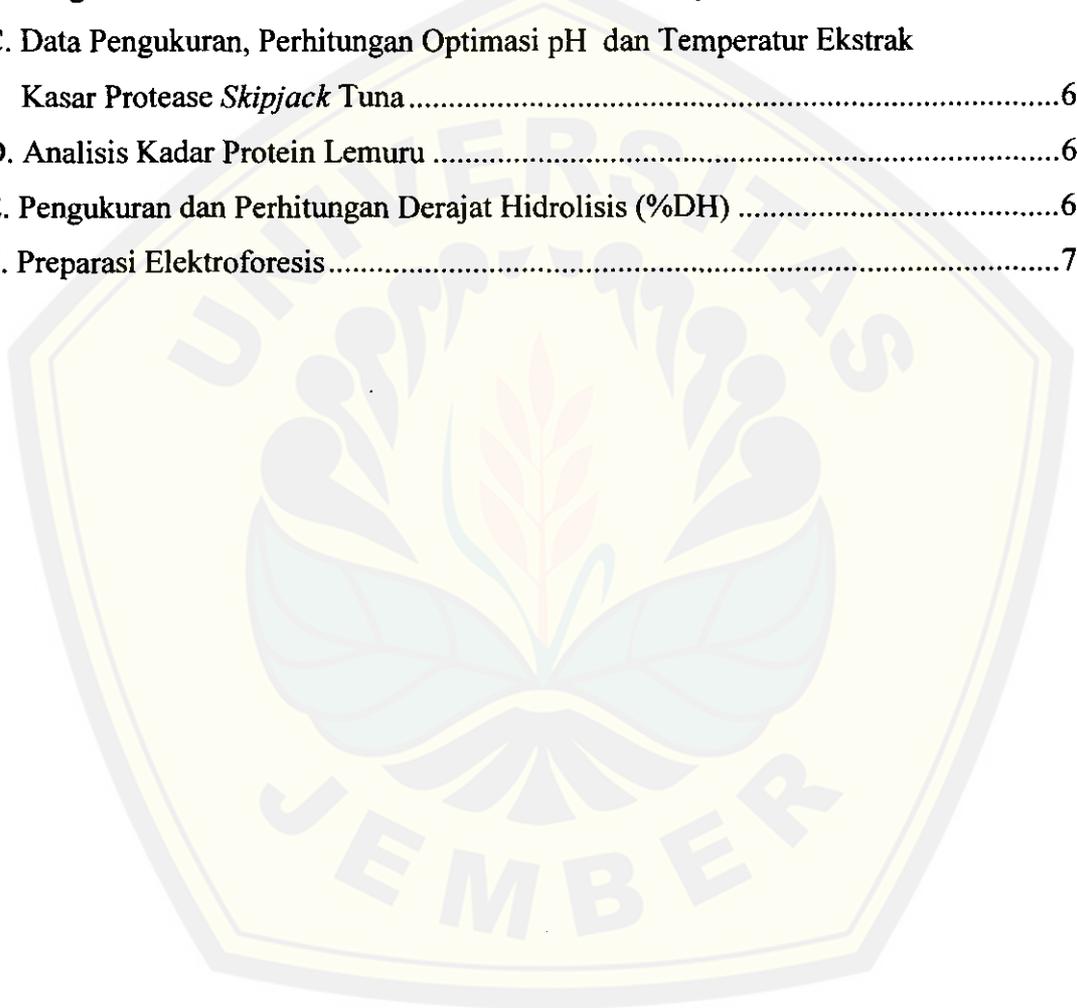


DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1. Ikan <i>Skipjack</i> Tuna (<i>Katsuwonus pelamis</i>).....	6
2.2. Ikan Lemuru (<i>Sardinella sp.</i>).....	8
2.3. Ikatan Peptida dalam Polipeptida	10
2.4. Struktur Molekul Asam Amino	11
2.5. Dua Puluh Asam Amino yang Terdapat dalam Protein.....	12
2.6. Reaksi Hidrolisis Protein	15
2.7. Mekanisme Katalisis Pepsin	23
2.8. Mekanisme Katalisis Kimotripsin	25
4.1. Ikan <i>Skipjack</i> Tuna (<i>Katsuwonus pelamis</i>).....	35
4.2. Ekstrak Kasar Protease dari Isi Perut Ikan <i>Skipjack</i> Tuna.....	37
4.3. Pengaruh pH terhadap Aktivitas Spesifik Ekstrak Kasar Protease Ikan <i>Skipjack</i> Tuna (<i>Katsuwonus pelamis</i>)	39
4.4. Pengaruh Suhu terhadap Aktivitas Spesifik Ekstrak Kasar Protease Ikan <i>Skipjack</i> Tuna (<i>Katsuwonus pelamis</i>) pada pH 2	41
4.5. Pengaruh Suhu terhadap Aktivitas Spesifik Ekstrak Kasar Protease Ikan <i>Skipjack</i> Tuna (<i>Katsuwonus pelamis</i>) pada pH 8	43
4.6. Hidrolisat Protein Ikan Lemuru Hasil Hidrolisis dengan Menggunakan Ekstrak Kasar Protease dari <i>Skipjack</i> Tuna pada pH 2 dan Suhu 40 ⁰ C	44
4.7. Hidrolisat Protein Ikan Lemuru Hasil Hidrolisis dengan Menggunakan Ekstrak Kasar Protease dari <i>Skipjack</i> Tuna pada pH 8 dan Suhu 40 ⁰ C	44
4.8. Reaksi Titrasi Formol	46
4.9. Derajat Hidrolisis Lemuru pada pH 2 dan Suhu 40 ⁰ C.....	47
4.10. Derajat Hidrolisis Lemuru pada pH 8 dan Suhu 40 ⁰ C.....	48
4.11. Elektroforegram Sampel Hasil Hidrolisis Asam (pH 2) dan Kontrol.....	50
4.12. Elektroforegram Sampel Hasil Hidrolisis Basa (pH 8) dan Kontrol	51

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Analisis Kadar Protein Ekstrak Kasar Protease Protease	60
B. Pengukuran Absorbansi Tirosin dan Kurva Standarnya	61
C. Data Pengukuran, Perhitungan Optimasi pH dan Temperatur Ekstrak Kasar Protease <i>Skipjack</i> Tuna	62
D. Analisis Kadar Protein Lemuru	67
E. Pengukuran dan Perhitungan Derajat Hidrolisis (%DH)	69
F. Preparasi Elektroforesis	77





BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Ikan merupakan salah satu sumber daya alam yang memegang peranan penting dalam pemenuhan kebutuhan gizi masyarakat khususnya protein karena memiliki kandungan protein yang tinggi. Menurut Meyer (1974), bahwa protein ikan mengandung asam-asam amino yang sangat dibutuhkan tubuh sehingga konsumsi 20-24 gram protein ikan perhari dalam makanan cukup memenuhi kebutuhan protein.

Ikan lemuru (*Sardinella sp.*) merupakan produk perikanan terbesar di Jawa Timur dengan jumlah 153.985 ton (tahun 1998) yang terus meningkat setiap tahunnya. Dilain pihak, harga jual ikan lemuru semakin menurun setiap tahunnya yakni pada tahun 2000 sebesar Rp. 2200/kg, tahun 2001 sebesar Rp. 2.048/kg dan tahun 2002 sampai 2003 sebesar Rp. 600/kg (Dinas Perikanan Jawa Timur dalam Badan Pusat Statistik, 2003). Penurunan harga jual tersebut karena ikan lemuru mudah busuk, bersisik tebal, berdaging tipis dan berduri banyak, sehingga kurang disukai konsumen.

Saat ini usaha meningkatkan nilai ekonomis dan menyelamatkan sumber pangan yang kaya protein dan asam lemak essensial ini dilakukan dengan cara penganekaragaman hasil olah ikan misalnya pengasinan, pengalengan dan pemindangan. Namun, usaha tersebut tidak cukup untuk meningkatkan nilai ekonomis dari ikan lemuru karena tidak banyak merubah karakter ikan yang tidak disukai konsumen. Selain itu, ikan lemuru juga dimanfaatkan untuk bahan baku dalam industri tepung ikan. Tepung ikan hanya digunakan untuk memenuhi industri pakan ternak dan tidak dapat digunakan sebagai makanan tambahan (*food supplement*). Saat ini teknologi pangan semakin meningkat dan pengolahan ikan juga mengalami perkembangan yaitu secara enzimatik. Menurut Hendritomo dkk (2000)

bahwa pengolahan ikan secara enzimatik dapat meningkatkan kualitas hasil olahan ikan.

Pengolahan ikan secara enzimatik merupakan pengolahan dengan bantuan enzim proteolitik. Enzim proteolitik merupakan enzim yang menghidrolisis molekul protein besar menjadi molekul yang lebih kecil dan sederhana. Dengan demikian pengolahan ikan yang dihasilkan secara enzimatik memiliki molekul protein yang lebih sederhana sehingga mempertinggi daya cerna protein dalam tubuh.

Indonesia yang memiliki potensi perikanan yang begitu besar mendorong berkembangnya industri pengalengan ikan terutama ikan tuna. Dari industri tersebut dihasilkan limbah berupa kepala dan isi perut ikan. Limbah ini sebagian kecil digunakan sebagai bahan baku industri tepung ikan yang dimanfaatkan sebagai pakan ternak yang bernilai ekonomi rendah. Sedangkan di negara-negara maju, limbah dari industri pengalengan ikan tersebut telah banyak dimanfaatkan sebagai sumber enzim proteolitik dalam industri hidrolisat protein ikan (HPI) yang bernilai ekonomi tinggi.

Dalam industri HPI, rantai panjang polipeptida ikan dihidrolisis secara enzimatik menjadi rantai polipeptida yang lebih pendek dan memiliki sifat fisiko-kimia yang berbeda dengan protein ikan semula. HPI dengan derajat hidrolisis sekitar 10% (rendah), dapat dimanfaatkan dalam berbagai aplikasi yang berhubungan dengan peningkatan cita rasa dalam soup, saus dan daging olahan (Clemente *et al.*, 1999). Sedangkan HPI dengan derajat hidrolisis lebih dari 10% (besar, *extensive hydrolysis*), dapat meningkatkan karakteristik nutrisi protein, misalnya menghilangkan faktor alergi (Vioque *et al.*, 2000) dan memudahkan penyerapan protein oleh tubuh sehingga dapat digunakan sebagai produk suplemen nutrisi dalam diet kesehatan serta dapat digunakan sebagai suplemen pakan udang yang sangat baik (Co'rdova-Murueta and Garcí'a-Carren'o, 2002).

Isi perut ikan merupakan sumber protease yang mudah dan murah untuk digunakan dalam industri HPI. (Gildberg *et al.*, 2002; Kristinsson and Rasco, 2000). Isi perut ikan tuna sangat potensial digunakan sebagai sumber protease dalam industri HPI, karena dalam perut ikan terdapat organ pencernaan tempat protein dihidrolisis

yang mengandung banyak protease. Protease dari isi perut ikan yang sudah dilaporkan, misalnya: proteinase dari isi perut ikan *crayfish* (Kim *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 1994), ikan *digfish* (Ramakrishna *et al.*, 1987), ikan *mackerel* (Kim and Pyeun, 1986) dan dari limpa tuna (Klomklao, 2004). Protease yang terdapat dalam isi perut ikan sangat bervariasi, bergantung pada jenis makanan dan spesies ikan itu sendiri. Bahkan dari jenis ikan yang sama, protease yang berbeda (jumlah dan jenisnya) terdapat dalam setiap organ yang berlainan dari isi perutnya (Torrison, 1984).

Dalam industri hidrolisat protein ikan, ikan yang digunakan adalah ikan kecil yang bernilai ekonomi rendah seperti ikan lemuru. Dengan cara ini nilai ekonomis dari ikan lemuru akan meningkat. Ikan yang digunakan sebagai sumber protease haruslah memiliki karakteristik sebagai ikan predator ikan-ikan kecil yang memiliki ukuran seperti ikan lemuru, karena protease yang terdapat di dalam isi perutnya memiliki kemampuan untuk menghidrolisis protein ikan dengan ukuran tersebut. Dalam penelitian ini, isi perut ikan yang digunakan sebagai sumber protease adalah ikan tuna jenis *skipjack* (*Katsuwonus pelamis*) karena selain sesuai dengan karakteristik tersebut, juga dapat memanfaatkan limbah dari industri pengalengan ikan tuna.

Mengacu pada uraian tersebut maka diperlukan uji aktivitas (karakterisasi) ekstrak kasar dari isi perut ikan *skipjack* tuna untuk mengetahui besarnya aktivitas protease untuk menghidrolisis protein ikan. Dalam penelitian ini protease ikan digunakan untuk menghidrolisis protein ikan lemuru (*Sardinella sp.*) untuk menghasilkan hidrolisat protein ikan (HPI).

1.1 Perumusan Masalah

Terdapat beberapa permasalahan yang menjadi ruang lingkup dalam penelitian ini, antara lain:

- a. Bagaimana mendapatkan ekstrak kasar protease dari isi perut ikan *skipjack* tuna (*Katsuwonus pelamis*)?
- b. Bagaimana profil aktivitas ekstrak kasar protease dari isi perut ikan *skipjack* tuna (*Katsuwonus pelamis*) terhadap protein standar?

- c. Bagaimana profil hasil hidrolisis protein ikan lemuru menggunakan ekstrak kasar protease dari isi perut ikan *Skipjack* tuna (*Katsuwonus pelamis*)?

1.2 Batasan Masalah

- a. Ikan *skipjack* tuna (*Katsuwonus pelamis*) yang digunakan berukuran minimal 40 cm.
- b. Isi perut ikan yang digunakan dalam penelitian ini adalah isi perut ikan *skipjack* tuna (*Katsuwonus pelamis*).
- c. Isi perut ikan yang digunakan sebagai sumber ekstrak kasar protease adalah bagian lambung dan usus.
- d. Karakteristik HPI lemuru yang dipelajari adalah persen derajat hidrolisis (%DH) dan profil elektroforegramnya.

1.3 Tujuan Penelitian

Beberapa tujuan yang hendak dicapai dalam serangkaian penelitian ini adalah:

- a. Mendapatkan ekstrak kasar protease dari isi perut ikan *skipjack* tuna (*Katsuwonus pelamis*).
- b. Mengetahui profil aktivitas ekstrak kasar protease dari isi perut ikan *skipjack* tuna (*Katsuwonus pelamis*) terhadap protein standar.
- c. Mengetahui profil hasil hidrolisis protein ikan lemuru menggunakan ekstrak kasar protease dari isi perut ikan *skipjack* tuna (*Katsuwonus pelamis*).

1.4 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini dapat bermanfaat bagi pengembangan industri hidrolisat protein ikan (HPI) di Indonesia dimana hingga saat ini belum ada industri HPI di Indonesia. Selain itu, penelitian ini dapat bermanfaat dalam pengolahan limbah industri pengalengan ikan tuna yang berupa isi perut ikan dan meningkatkan nilai ekonomi dari ikan lemuru (*Sardinella sp.*). Selanjutnya, dari hasil penelitian ini diharapkan mampu memberikan informasi tentang aktivitas protease yang terkandung

dalam isi perut ikan *skipjack* tuna (*Katsuwonus pelamis*) sebagai enzim yang mengkatalisis hidrolisis protein.

Hasil dari penelitian ini selain dapat dimanfaatkan untuk riset selanjutnya, juga bermanfaat pula bagi sektor industri khususnya pengolahan pangan lainnya terutama produk perikanan dan kelautan yang belum mengaplikasikan teknologi enzimatik pada salah satu prosesnya.





BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Skipjack Tuna (*Katsuwonus pelamis*)

Skipjack tuna pertama kali dideskripsikan oleh Carl Linnaeus (1758), yang diberi nama *Scomber pelamis* (gambar 2.1). Hingga saat ini, penggolongan *skipjack* tuna masih diperdebatkan, ada yang menggolongkannya dalam genus *Euthynnus* dan ada yang menggolongkannya dalam genus *Katsuwonus*. Nama jenis *pelamis* diambil dari bahasa latin “*tunny*” (tong). Nama lain dari tuna ini antara lain: *Scomber pelamides* Lacepede, 1880; *Scomber pelamys* Bloch & Synder, 1801; *Thynnus pelamys* Cuvier, 1817; *Thynnus vagans* Pelajaran, 1826; *Orcynus Pelamy* Poey, 1875; dan *Gymnosarda pelamis* Dresslar & Fesler, 1889 (Gardieff, 2006).



Sumber: Freitas, 2006

Gambar 2.1. Ikan *Skipjack* tuna (*Katsuwonus pelamis*)

Secara ilmiah taksonomi ikan *Skipjack* tuna diklasifikasikan oleh Linnaeus (1758) dalam:

Kingdom : Animalia
 Philum : Chordata
 Sub-Philum : Vertebrata
 Kelas : Osteichthyes
 Orde : Perciformes

Famili : Scombridae
Genus : Katsuwonus
Spesies : *Katsuwonus pelamis* Linnaeus (1758)
(Ushioda, 2002)

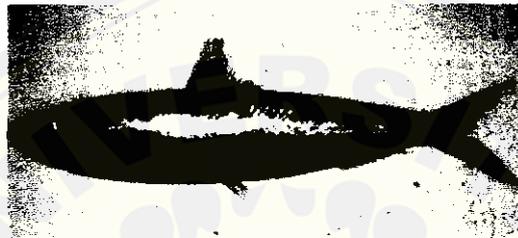
Skipjack tuna memiliki bentuk badan yang lancip. Badan tidak bersisik kecuali pada bagian korselet dan gurat sisi. Sebuah plat tulang pada batang ekor, dua selaput kulit diantara sirip perut, badan bagian punggung biru keunguan dan bagian perut keperakan dengan 4-6 strip kehitaman mendatar (Anonymous, 2007a). Pada bagian atas tulang belakangnya terdapat dua sirip diikuti oleh 7 hingga 9 finlet (sirip kecil) yang bermanfaat untuk mengurangi turbulensi dan mengontrol kendali saat berenang pada kecepatan tinggi. Pada bagian bawah juga terdapat dua sirip yang diikuti oleh 7 atau 8 finlet (Gardieff, 2006)

Skipjack tuna merupakan salah satu dari lima spesies tuna yang telah ditangkap selama berabad-abad. *Skipjack* tuna tersebar di seluruh lautan di daerah tropis, sepanjang pantai Eropa dan laut utara, namun tidak terdapat di laut tengah dan laut hitam. Di Indonesia, jumlah tangkapan ikan *Skipjack* tuna sebesar 84.205 ton pertahun (tahun 2001). Pada umumnya, ikan ini memiliki berat 8-10 kg (7-22 pon) dan panjang 80 cm (32 inci), namun juga dapat tumbuh maksimum hingga 34,5 kg (76 pon) dan panjang 108 cm (43 inci). Makanan *Skipjack* tuna terdiri dari beberapa jenis ikan, *crustacea* dan *mollusca*. Ikan yang umum dimakan adalah jenis ikan haring, sejenis ikan hering kecil dan ikan sarden (Gardieff, 2006).

2.2 Ikan Lemuru (*Sardinella* sp.)

Ikan-ikan lemuru yang tertangkap di perairan Indonesia terdiri dari beberapa jenis yang dalam statistik perikanan Indonesia digabung menjadi satu dengan nama lemuru (*S. longiceps* Valenciennes). Jenis-jenis ikan tersebut adalah *S. longiceps* Valenciennes, *S. aurita* non Valenciennes, *S. leiogaster*, *S. clupeioides*, *S. sirm*, *S. fimbriata* dan *S. lemuru* (Sinonim: *Amblygaster posterus* Whitley, *Clupea nymphaea* Richardson, *S. aurita* non Valenciennes, *S. longiceps* non Valenciennes, *S.*

samarensis Roxas). Berdasarkan hasil revisi Wongratana pada tahun 1980, nama yang digunakan untuk *S. longiceps* Valenciennes adalah *S. lemuru* Bleeker, 1853, sedangkan nama internasionalnya adalah *Bali Sardinella*. Ikan lemuru banyak ditangkap di perairan laut Jawa dan selat Bali (Mahrus 1997). Ikan lemuru memiliki nilai ekonomis yang relatif rendah karena mudah membusuk dan bersisik banyak sehingga kurang disukai untuk dikonsumsi dalam bentuk segar.



Sumber: Anonymous, 2007b
Gambar 2.2 Ikan Lemuru (*Sardinella lemuru* Bleeker, 1853)

Secara ilmiah ikan lemuru diklasifikasikan oleh Bleeker (1853) (Whitehead, 2007) dalam:

Kingdom	: Animalia
Philum	: Chordata
Subphilum	: Vertebrata
Kelas	: Actinopterygii
Orde	: Clupeiformes
Famili	: Clupeidae
Genus	: Sardinella
Spesies	: <i>Sardinella lemuru</i> Bleeker, 1853

Ikan lemuru memiliki bentuk badan memanjang dan bagian perut sebelum sirip perut membulat. Badan berwarna keperakan dengan biru gelap pada bagian belakang, tidak terdapat bercak gelap pada dasar sirip punggung dan pinggiran tepi sirip ekor berwarna gelap (Anonymous, 2007b).

Ikan lemuru terdapat di perairan pantai dan pelagis, memakan phytoplanton dan zooplankton. Panjang maksimum dapat mencapai 23 cm. Daerah penyebarannya terdapat di samudra Hindia bagian timur dan Pasifik bagian barat, laut cina selatan, Indonesia bagian barat, Australia bagian barat, Filipina, China, Taiwan dan Jepang bagian selatan. *Sardinella lemuru* mudah dibedakan dari semua *clupeid* lainnya dengan 9 jari-jari sirip perutnya (Anonymous, 2007b). Ikan lemuru merupakan produk perikanan terbesar di Jawa Timur dengan jumlah tangkapan sebesar 153.985 ton (tahun 1998) (Dinas Perikanan Jawa Timur dalam Badan Pusat Statistik, 2003).

Kandungan ikan lemuru dalam 100 gram ikan dapat dijelaskan pada tabel 2.1 di bawah ini:

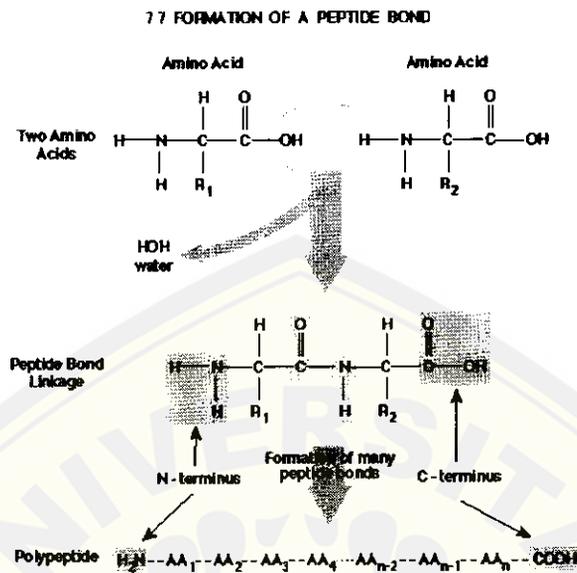
Tabel 2.1. Komposisi kimia lemuru tiap 100 gram

Komponen	Jumlah
Air (gram)	76
Protein (gram)	20
Lemak (gram)	3
Karbohidrat (gram)	0
Ca ²⁺ (mg)	20
Fosfor (mg)	100
Fe (mg)	1
Vitamin A (SI)	100
Vitamin B1 (mg)	0,05

Sumber: Winarno, 1993

2.3 Protein

Protein merupakan makromolekul yang terdiri dari satu atau lebih rantai polipeptida yang membentuk struktur 3 dimensi tertentu. Rantai polipeptida sendiri adalah polimer dari asam amino yang terikat satu sama lain oleh ikatan peptida ($-\text{CO}-\text{NH}-$) (lihat Gambar 2.3). Setelah terikat dalam rantai polipeptida, asam amino-asam amino ini dinamakan sebagai residu asam amino. Setiap rantai polipeptida selalu memiliki 2 ujung yang berbeda, yaitu ujung karboksil (C-terminal) dan amina (N-terminal) (Solomon, 1990:983).



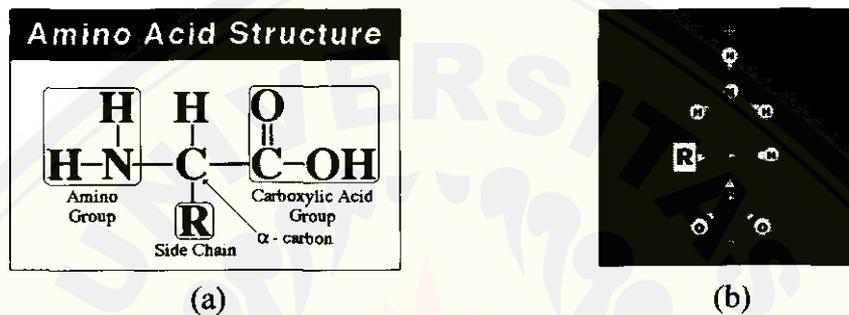
Gambar 2.3 Ikatan Peptida dalam Polipeptida

Sebuah molekul protein tersusun atas sejumlah asam amino yang saling berikatan. Ikatan yang terjadi antara asam amino dengan gugus karboksil dari asam amino lain dengan mengeluarkan satu molekul air dinamakan ikatan peptida atau dengan kata lain pada protein, gugus karboksil α -asam amino terikat pada α -asam amino lain dengan ikatan peptida (ikatan amida substitusi) dengan reaksi kondensasi yang kuat (Arbianto, 1996).

Terdapat 20 jenis asam amino yang telah dikenal sebagai penyusun protein di alam (Gambar 2.5). Sepuluh jenis asam amino diantaranya diperlukan oleh tubuh dan tidak dapat disintesis langsung oleh tubuh sehingga harus diperoleh dari makanan (asam amino esensial). Sedangkan asam amino sisanya dapat disintesis sendiri oleh tubuh dan sering disebut dengan asam amino non esensial. Asam amino yang termasuk dalam golongan esensial adalah valin, leusin, isoleusin, fenilalanin, triptofan, treonin, metionin, lisin, arginin dan histidin. Asam amino non esensialnya adalah glisin, alanin, asparagin, glutamin, prolin, serin, tirosin, sistein, asam aspartat dan asam glutamat (Solomon, 1990:973-975).

2.3.1 Asam amino

Suatu protein jika dihidrolisis dengan asam, alkali atau enzim akan menghasilkan campuran asam amino. Molekul asam amino tersusun dari sebuah gugus amino, sebuah gugus karboksil, sebuah atom hidrogen H dan gugus R tertentu, yang semuanya terikat pada sebuah atom C yang dikenal dengan karbon- α (Gambar 2.4), kecuali glisin (Stryer, 2000).

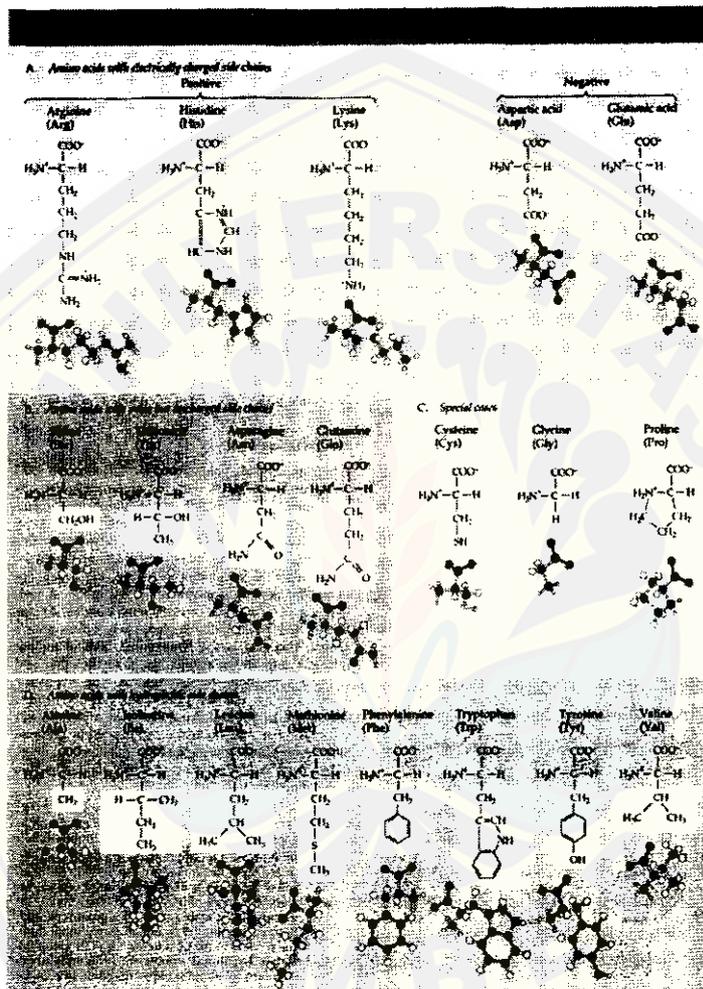


Gambar 2.4. Struktur molekul asam amino, (a) bentuk tak terionisasi; (b) bentuk ion dipolar (*Zwitterion*).

Larutan asam amino pada pH netral berada sebagai ion dipolar atau *zwitterion* dan bukan sebagai molekul terionisasi. Sebagai bentuk dipolar, gugus amina berada dalam bentuk terionisasi ($-\text{NH}_3^+$) dan gugus karbonil dalam bentuk terionisasi ($-\text{COO}^-$). Status ionisasi suatu asam amino ini bervariasi tergantung pada pH. Pada larutan asam (pH 1,0), gugus karboksil akan berada dalam bentuk tak terionisasi ($-\text{COOH}$) dan gugus amina dalam bentuk terionisasi ($-\text{NH}_3^+$), sedangkan dalam larutan alkali (pH 11,0), gugus karboksil berada sebagai bentuk terionisasi ($-\text{COO}^-$) dan gugus amina dalam bentuk tak terionisasi ($-\text{NH}_2$).

Hampir semua asam amino dapat larut dalam air dan tak larut dalam pelarut-pelarut non polar seperti eter, kloroform dan aseton. Sifat ini tidak sesuai dengan sifat karboksilat dan amina organik pada umumnya. Asam karboksilat baik alifatik maupun aromatik terutama yang mengandung beberapa atom karbon sangat sukar larut dalam air, akan tetapi mudah larut dalam pelarut organik. Begitu pula dengan amina, umumnya larut dalam pelarut organik dan tidak larut dalam air. Bergantung

pada pelarutnya, asam amino dipandang sebagai elektrolit dalam larutan. Sebagai contoh adalah asam amino alanin yang dapat bereaksi dengan asam atau basa, sehingga dapat dikatakan bersifat amfoterik (Girinda, 1990).



Gambar 2.5. Dua puluh asam amino yang terdapat di dalam protein.
Sumber: Microbial genetics, 2004

2.3.2 Karakteristik Protein Ikan

Protein ikan merupakan protein hewani berkualitas tinggi karena memiliki komposisi asam amino yang lengkap, kandungan nutrisi yang sempurna dan mudah dicerna. Namun, karena sangat mudah rusak selama penyimpanan dan komposisi

kimia yang sangat variatif menyebabkan pemanfaatan ikan sebagai bahan dasar makanan perlu penanganan khusus (Kristinsson and Rasco, 2000a).

Secara umum, protein (daging) ikan cenderung memiliki sedikit jaringan penghubung bila dibandingkan dengan daging hewan daratan, sehingga daging ikan menjadi lebih lembut. Selain itu, ikan merupakan hewan berdarah dingin sehingga lebih sensitif terhadap panas dibandingkan hewan daratan yang berdarah panas (Hultin dalam Kristinsson and Rasco, 2000a). Akibatnya daging ikan lebih mudah terdenaturasi (rusak) bila terjadi kenaikan temperatur. Kecepatan denaturasi protein daging ikan dari spesies ikan yang hidup di air dingin (sub tropis) cenderung lebih tinggi dibandingkan dengan spesies ikan di perairan tropis (Venugopal and Shahidi dalam Kristinsson and Rasco, 2000a).

Komposisi protein dalam daging ada tiga jenis, yaitu otot polos (*smooth*), otot lurik (*striated*) dan otot jantung (*cardiac*). Otot lurik paling dominan dalam ikan. Otot ikan lazimnya berupa daging berwarna putih dan hitam. Daging berwarna putih yang umumnya melimpah, mengandung lipid lebih sedikit dibandingkan daging berwarna hitam. Daging berwarna putih cenderung lebih banyak dikonsumsi (Suzuki, 1981).

Myofibril merupakan protein utama dalam daging ikan, yaitu sekitar 66-77% dari total protein ikan. Myofibril adalah kompleks protein yang tersusun dari myosin dan actin. Myosin berupa filamen tebal dan actin berupa filamen tipis. Kandungan myosin dalam protein kontraktile myofibril dapat mencapai 50-60%, sedangkan actin hanya 15-30% (Hultin, Hio; Suzuki, T dalam Kristinsson and Rasco, 2000a). Dalam protein otot tunggal, kandungan myosin dapat mencapai lebih dari 38% dan merupakan molekul yang besar dengan dua rantai berat yang identik (223 kDa) dan dua rantai ringan (22 dan 18 kDa). Dua daerah kepala globular dari myosin yang identik terhubung dengan rantai ringan yang panjang berbentuk α -helik. Myosin dapat dipecah oleh enzim protease pada dua tempat. Papain dapat memecah pada daerah dekat kepala globular menghasilkan kepala dan ekor. Sedangkan tripsin dan kimotripsin dapat memecah pada daerah yang lebih jauh dari daerah kepala,

menghasilkan *heavy meromyosin* (potongan dengan daerah kepala) dan *light meromyosin* (Zubay, 1993).

2.3.3 Hidrolisat Protein Ikan (HPI)

Hidrolisat adalah protein yang telah didegradasi menjadi peptida dengan berbagai ukuran secara kimia atau enzimatis. Hidrolisat protein diproduksi untuk memperluas variasi penggunaan dalam industri makanan, seperti pengganti susu, suplemen protein, *stabilizer* minuman dan peningkatan flavor (aroma) pada pabrik gula (Skanderby dalam Normah *et al.*, 2005). Protein ikan merupakan salah satu jenis bahan protein yang telah banyak dikembangkan dalam pembuatan hidrolisat (Hidrolisat Protein Ikan, HPI), seperti daging ikan sardin, hiu, kapelin, herring dan salmon (Quaglia and Orban; Hoyle and Merrit; Shahidi *et al.*; Onodenalore and Shahidi dalam Kristinsson and Rasco, 2000a dan Kristinsson and Rasco, 2000b).

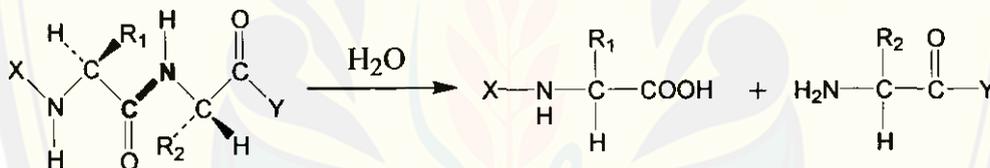
Proses pembuatan HPI secara biokimia dapat berlangsung secara autolitik (pemanfaatan enzim proteolitik yang terdapat dalam organ pencernaan ikan itu sendiri) atau dengan penambahan enzim proteolitik dari luar. Hidrolisis autolitik merupakan proses yang sangat sederhana dan hanya memerlukan optimalisasi parameter hidrolisis, seperti temperatur, waktu inkubasi dan pH (Kristinsson and Rasco, 2000a). Kristinsson and Rasco (2000b) menggunakan ekstrak protease serin dari isi perut ikan salmon untuk memproduksi HPI dan Klomklao *et al.* (2004) mempelajari aktivitas proteolisis ekstrak limpa dari 3 spesies ikan tuna (skipjack, yellowfin dan tongkol) yang berpotensi untuk digunakan dalam pembuatan HPI.

Produk hidrolisat protein dari bahan baku ikan ditentukan oleh jenis ikan yang digunakan. Pemanfaatan ikan yang mengandung banyak lemak akan menghasilkan hidrolisat dengan kandungan lemak tinggi, sehingga akan mempersingkat masa simpan. Hidrolisat protein yang dibuat dari ikan berlemak rendah (*non fatty fish*) mengandung protein 85-90%, lemak 2-4% dan abu 6-7% berdasarkan berat kering. Salah satu keuntungan terbesar dari produk ini adalah semua jenis hasil samping perikanan dan ikan-ikan rucah (bernilai ekonomis rendah) dapat digunakan untuk

memproduksi hidrolisat dibandingkan produk-produk perikanan lainnya yang hanya dapat diproduksi dengan jenis-jenis ikan tertentu (Pigot and Tucker, 1990).

2.3.4 Hidrolisis Protein

Ikatan peptida yang membangun rantai polipeptida dalam protein dapat diputus (dihidrolisis) menggunakan asam, basa atau enzim (Mathews and van Holde, 1990:147). Pemecahan ikatan peptida dalam kondisi asam atau basa kuat merupakan proses hidrolisis kimia dan pemecahan ikatan peptida menggunakan enzim merupakan proses hidrolisis biokimia (Kristinsson and Rasco, 2000a). Reaksi hidrolisis peptida akan menghasilkan produk reaksi yang berupa satu molekul dengan gugus karboksil dan molekul lainnya memiliki gugus amina (lihat Gambar 2.6) (Whitaker, 1994:469).



Gambar 2.6 Reaksi Hidrolisis Protein

a. Hidrolisis Asam/Basa

Metode hidrolisis protein secara kimia dapat dilakukan menggunakan asam kuat atau basa kuat dalam konsentrasi tinggi. Penggunaan asam dalam proses pengolahan makanan lebih sering dilakukan daripada penggunaan basa. Metode hidrolisis seperti ini telah lama dikenal dan diterapkan dalam industri makanan, namun cukup sulit untuk mengontrol proses hidrolisisnya. Hidrolisis protein menggunakan asam atau basa dalam industri makanan sangat tidak menguntungkan. Bahan makanan yang diproses menggunakan metode asam atau basa akan menghasilkan produk yang memiliki nilai nutrisi dan sifat fungsional yang rendah (Kristinsson and Rasco, 2000a).

Hidrolisis menggunakan asam menghasilkan produk (hidrolisat) yang memiliki kelarutan tinggi. Asam yang sering digunakan adalah asam klorida (6 N) pada temperatur dan tekanan tinggi untuk mendapatkan hidrolisis protein yang sempurna (Thakar *et al.* dalam Kristinsson and Rasco, 2000a). Selanjutnya, perlu dilakukan netralisasi sisa asam dan dalam hidrolisat terkandung kadar garam (NaCl) yang tinggi sehingga dapat mempengaruhi sifat fungsional makanan. Selain itu, hidrolisis asam juga dapat merusak triptofan yang merupakan salah satu jenis asam amino yang dibutuhkan oleh tubuh (Kristinsson and Rasco, 2000a).

Penggunaan basa dalam hidrolisis protein menghasilkan produk (hidrolisat) yang memiliki kelarutan rendah. Kelarutan hidrolisat yang rendah ini berkaitan dengan hasil hidrolisis yang berupa molekul polipeptida yang cukup besar. Selain itu, hidrolisat yang dihasilkan juga memiliki sifat fungsional yang rendah. Beberapa asam amino, seperti sistein, serin dan treonin, dapat hilang selama proses hidrolisis protein (Kristinsson and Rasco, 2000a).

b. Hidrolisis Enzimatis

Proses hidrolisis protein secara enzimatis dapat dilakukan dengan penambahan enzim spesifik untuk hidrolisis ikatan peptida, yaitu enzim proteolitik (protease). Pemotongan ikatan peptida yang dilakukan oleh protease sangat spesifik pada daerah residu asam amino tertentu. Beberapa protease disekresikan dalam sistem pencernaan hewan untuk mendegradasi protein menjadi molekul polipeptida atau asam amino yang mudah untuk diserap (Mathews and van Holde, 1990:147). Contoh protease yang telah banyak dikenal adalah papain, tripsin, kimotripsin, bromelin dan pepsin.

Proses hidrolisis protein secara enzimatis merupakan suatu proses yang berguna untuk meningkatkan atau memodifikasi sifat fisikokimia, fungsional dan penampilan (visual) alami protein tanpa mengurangi nilai nutrisi makanan dan dapat juga meningkatkan daya serap protein (Phillips and Beuchat dalam Kristinsson and Rasco, 2000a).

2.4 Enzim

Enzim merupakan unit fungsional dari metabolisme sel yang bekerja dengan urutan yang teratur. Enzim mengkatalisis ratusan reaksi bertahap yang menguraikan molekul nutrien, reaksi yang menyimpan dan mengubah reaksi kimiawi dan yang membuat makro molekul sel dari prekursor sederhana. Enzim memiliki tenaga katalitik yang luar biasa, yang biasanya jauh lebih besar dari katalisator sintetik. Enzim mengkatalisis reaksi kimia spesifik dengan cara menurunkan energi bebas aktivasi. Spesifitas enzim amat sangat tinggi terhadap substratnya. Enzim mempercepat reaksi kimiawi spesifik tanpa pembentukan produk samping dan molekul ini berfungsi dalam larutan encer pada keadaan suhu dan pH normal (Lehninger, 1982:235).

2.4.1 Mekanisme Katalisis Enzim

Dalam hal katalisis reaksi kimia secara enzimatis, banyak teori yang dapat menjelaskan bagaimana substrat berinteraksi dengan enzim menghasilkan produk dan enzim kembali. Menurut Voet and Voet (2004:496-507) ada beberapa tipe mekanisme katalisis yang dilakukan oleh enzim, yaitu:

a. *Katalisis asam-basa*

Mekanisme katalisis ini menjelaskan bahwa enzim dapat berperan sebagai asam dan basa dalam interaksinya dengan substrat membentuk kondisi transisi enzim-substrat dan mengubah substrat menjadi produk. Reaksi biokimia yang dapat dijelaskan dengan katalisis asam-basa antara lain: hidrolisis peptida dan ester, reaksi gugus fosfat, tautomerisasi dan adisi gugus karbonil.

b. *Katalisis kovalen*

Dalam mekanisme ini, terjadi pembentukan keadaan transisi enzim-substrat yang terikat secara kovalen untuk mempercepat kecepatan reaksi substrat. Walaupun enzim-substrat terikat kuat oleh ikatan kovalen, reaksi penguraiannya terjadi secara

sangat cepat dan menjadi penentu kecepatan reaksi enzimatik. Contoh reaksi yang dapat dijelaskan oleh mekanisme ini adalah reaksi dekarboksilasi asetoasetat.

c. *Katalisis ion logam*

Mekanisme katalisis ini menjelaskan bahwa di dalam enzim terdapat ion logam yang terikat kuat (metaloenzim) ataupun terikat lemah (enzim teraktivasi-logam) di sisi aktifnya. Katalisis ion logam ini dapat dilakukan dengan cara: membentuk ikatan dengan substrat agar orientasinya tepat untuk bereaksi, sebagai perantara yang melakukan reaksi oksidasi-reduksi secara reversibel dan menyetabilkan elektrostatis/muatan negatif. Contoh reaksi yang mengikuti mekanisme ini adalah reaksi katalisis oleh enzim transferase fosforil.

d. *Katalisis elektrostatis*

Enzim melakukan proses katalisis dengan menyeimbangkan kondisi elektrostatis yang terdapat di sekitar sisi aktif enzim, yaitu elektrostatis substrat, enzim dan pelarut. Seimbangnya kondisi elektrostatis maka reaksi substrat membentuk produk dapat terjadi dengan lebih cepat.

2.4.2 Aktivitas Enzim

Aktivitas enzim merupakan banyaknya mol substrat yang diubah/dikatalisis oleh enzim per satuan waktu (Holme and Peck, 1998:280). Aktivitas enzim dapat menggambarkan besarnya konsentrasi enzim dalam suatu medium. Terdapat beberapa istilah yang menjelaskan tentang aktivitas enzim, yaitu: unit aktivitas enzim, aktivitas spesifik dan angka pergantian (*turnover number*). Menurut perjanjian internasional, satu unit aktivitas enzim adalah jumlah enzim yang menyebabkan perubahan 1 μmol (10^{-6} mol) substrat per menit pada suhu 25 °C dalam kondisi optimumnya. Aktivitas spesifik adalah jumlah unit aktivitas enzim per miligram protein. Angka pergantian (*turnover number*) adalah angka yang menunjukkan jumlah molekul substrat yang

diubah menjadi produk per satuan waktu oleh satu molekul enzim (Wirahadikusumah, 1989:62).

Penentuan aktivitas enzim dapat dilakukan dengan menggunakan berbagai metode. Metode yang akan digunakan harus menyesuaikan dengan reaksi yang berlangsung dalam katalisis enzim bersangkutan. Menurut Holme dan Peck (1998:282-294) ada beberapa metode yang dapat digunakan untuk memonitoring katalisis enzim (menentukan aktivitas enzim), yaitu: metode gasometri, spektrofotometri, fluorimetri, luminescence, elektrokimia dan mikrokalorimetri.

Menurut Wirahadikusumah (1989:60-61), penentuan besarnya aktivitas enzim harus memperhatikan beberapa faktor penting, yaitu:

1. Persamaan enzim yang dikatalisis oleh enzim tersebut.
2. Kebutuhan kofaktor tertentu, misalnya ion-ion logam atau koenzim.
3. Pengaruh konsentrasi substrat dan kofaktor.
4. pH optimum medium, pada keadaan ini enzim memiliki aktivitas paling besar.
5. Daerah temperatur saat enzim dalam keadaan mantap dan memiliki aktivitas paling tinggi (temperatur optimum).
6. Cara/metode yang digunakan untuk penentuan berkurangnya substrat atau bertambahnya hasil reaksi.

2.5 Enzim Proteolitik (Protease)

Enzim protease memiliki variasi pemilihan substrat yang lebih luas atau berbeda dalam hal aktivitasnya terhadap ikatan-ikatan peptida protein. Protease adalah enzim dengan massa molekuler kecil berkisar $15 \times 10^3 - 35 \times 10^3$ Dalton, kecuali untuk leusin aminopeptidase dengan molekul $\sim 250 \times 10^3$ Dalton (Fersht, 1985; Winarno, 1995).

Hanford (1967) serta Bergman dan Futon (Doelle, 1981; Winarno, 1995) merekomendasikan dua kelompok utama enzim protease yaitu golongan eksopeptidase (eksoprotease) dan endopeptidase (endoprotease). Eksopeptidase dibagi menjadi karboksi(ekso)peptidase dan amino(ekso)peptidase yang berturut-

turut memotong peptida dari arah gugus karbonil terminal dan gugus amino terminal. Sedangkan endopeptidase memecah protein atau ikatan peptida dari dalam (internal) peptida.

Klasifikasi lain diusulkan oleh Hartley berdasarkan sifat-sifat kimia dari lokasi aktif sehingga protease dapat dibagi menjadi empat kelompok (Fersht, 1985; Whitaker, 1994; Winarno, 1995), yaitu:

2.5.1 Protease Serin

Enzim ini memiliki residu serin dalam lokasi aktifnya dan bersifat endopeptidase, misalnya tripsin, kimotripsin, elastase, trombin, kallikrein, plasmin dan subtilin. Aktivitas enzim ini dihambat oleh diisopropil fluorofosfat (DFP), *soybean trypsin inhibitor* (STI), *l*-1-*p*-tosilamino-2-feniletil klorometilketon (TPCK), aprotinin dan fenilmetilsulfanil fluoride (PMSF).

2.5.2 Protease Sulfhidril (Protease Thiol, Protease Sistein)

Enzim ini memiliki residu sulfhidril dalam lokasi aktifnya, bersifat endopeptidase dan dihambat oleh senyawa oksidator, alkilator dan logam berat. Asam *p*-kloro merkuri benzoat (PCMB), iodoasetat (IAA), *n*-etilmaleimida (NEM) dan leupeptin merupakan inhibitor spesifik enzim ini. Protease dari tumbuhan dan mikroba seperti papain, fisin dan bromelin termasuk dalam golongan ini.

2.5.3 Protease Logam (Metalloprotease)

Aktivitas dari enzim ini tergantung pada eksistensi logam yang umumnya memenuhi hubungan stoikiometrik dengan satu mol logam untuk tiap mol enzim. Logam tersebut misalnya Magnesium (Mg), Zink (Zn), Kobal (Co), Besi (Fe), Merkuri (Hg), Nikel (Ni) dan sebagainya sehingga enzim ini dapat dihambat oleh asam etilendiamina tetraasetat (EDTA) yang dapat mengkelat logam dan menurunkan aktivitasnya, serta 1,10-fenantrolin. Karboksipeptidase A untuk beberapa aminopeptidase termasuk dalam golongan ini.

2.5.4 Protease Asam (Aspartil Protease, Karboksil Protease)

Enzim ini bersifat endopeptidase, memiliki dua gugus karboksil dalam lokasi aktifnya dan aktif hanya pada pH rendah, serta dapat dihambat oleh *p*-bromofenasilbromida dan pepstatin *A/pepstatineI*. Pepsin, *rennin*, *cathepsin D*, *chymosin* dan protease kapang termasuk dalam golongan ini.

Berdasarkan sumbernya, enzim protease dikategorikan menjadi tiga yaitu hewani, nabati dan mikroba (bakteri, ragi dan kapang). Enzim protease nabati meliputi papain, fisin dan bromelin, sedangkan pepsin, *rennin*, kolagenase hewan, tripsin, kimotripsinogen dan elastase bersumber dari hewani, serta yang bersumber dari mikroba seperti kimopapain, elastase, keratinase, kolagenase bakteri, subtilisin, *scytalidopepsin B* ragi dan *rennet* mikroba (Winarno, 1995).

a. Pepsin

Pepsin merupakan salah satu jenis protease yang memotong ikatan peptida di bagian tengah rantai polipeptida protein (endopeptidase) dan tergolong protease aspartil, yaitu memiliki residu asam aspartat pada sisi aktifnya (Whitaker, 1994:491; dan Drauz and Waldmann, Eds., 1995:437). Pepsin memiliki spesifikasi memotong ikatan peptida pada residu asam amino aromatik dan hidrofobik (Drauz and Waldmann, Eds., 1995:437), seperti: tirosin, leusil dan triptofan (Mathews and van Holde, 1990:146; dan Daflin, 1997:1071). Pepsin mampu memotong pada kedua sisi asam amino tersebut, namun lebih utama untuk memotong residu N-terminalnya (Whitaker, 1994:492) (lihat Tabel 2.2) sehingga hidrolisis protein dapat menghasilkan peptida dan asam amino bebas (Daflin, 1997:1071).

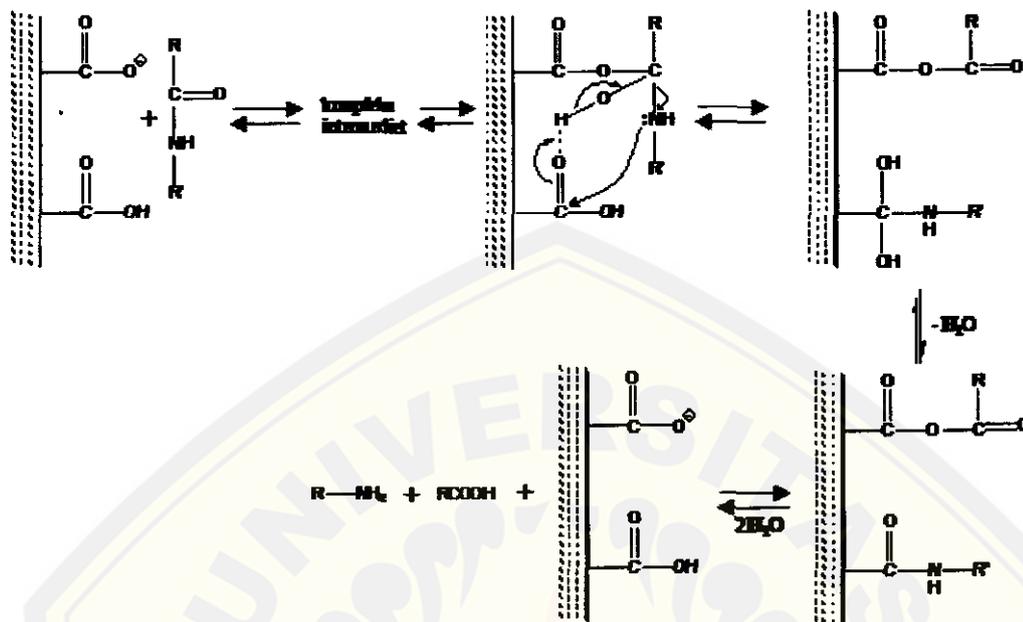
Tabel 2.2 Titik Pemotongan Peptida oleh Beberapa Protease

Enzim	Titik Pemotongan	R
Pepsin	$ \begin{array}{c} \text{R} \qquad \qquad \text{R}' \\ \qquad \qquad \\ \downarrow \quad \downarrow \\ -\text{CO}-\text{NHCHCO}-\text{NHCHCO}- \end{array} $	Tyr, Phe, Leu
Tripsin	$ \begin{array}{c} \text{R} \qquad \qquad \text{R}' \\ \qquad \qquad \\ \downarrow \quad \downarrow \\ -\text{CO}-\text{NHCHCO}-\text{NHCHCO}- \end{array} $	Arg, Lys
Kimotripsin	$ \begin{array}{c} \text{R} \qquad \qquad \text{R}' \\ \qquad \qquad \\ \downarrow \quad \downarrow \\ -\text{CO}-\text{NHCHCO}-\text{NHCHCO}- \end{array} $	Tyr, Trp, Phe, Met, Leu

Sumber: Devlin (Ed., 1997:1071).

Pepsin terdapat dalam organ pencernaan vertebrata (lambung) yang disekresikan dalam bentuk proenzim (enzim yang tidak aktif) pada getah lambung, yaitu pepsinogen. Pengaktifan pepsinogen menjadi pepsin aktif dilakukan dengan penambahan asam sampai kondisi sangat asam (pH 2) (Harrow and Mazur, 1962:131-132). Pepsin stabil pada daerah pH 2-5 dengan kondisi optimum pada pH 2 dan akan kehilangan aktivitasnya pada daerah pH di atas 5 (Whitaker, 1994:492). Menurut Schomburg dan Salzmann (Eds., 1991) terdapat 2 jenis pepsin, yaitu pepsin A (EC 3.4.23.1) dan pepsin B (EC 3.4.23.2) yang memiliki sifat katalisis sama. Sumber alami pepsin yang telah dapat diisolasi dengan baik adalah sapi, babi, ayam, domba dan beberapa jenis ikan (Whitaker, 1994:492).

Mekanisme katalisis pepsin dapat dijelaskan berdasarkan mekanisme katalisis kovalen (lihat Gambar 2.7). Reaksi katalisis diawali dengan pembentukan kompleks adsorptif enzim-substrat (intermediet tetrahedral kovalen) ketika substrat berada di dekat sisi aktif enzim dengan diikuti serangan nukleofil gugus karboksilat pada gugus karbonil ikatan peptida substrat. Pada tahap berikutnya, oksigen karbonil dari gugus karboksil terprotonasi mengambil proton dari gugus hidroksil yang dimudahkan dengan adanya serangan elektrofil karbon karbonil pada gugus NH ikatan peptida. Selanjutnya, intermediet aminoasil yang terbentuk bereaksi dengan air untuk menghasilkan produk reaksi (Whitaker, 1994:492-493).



Gambar 2.7 Mekanisme Katalisis Pepsin

b. Tripsin

Tripsin merupakan salah satu jenis endopeptidase dan tergolong protease serin, yaitu memiliki residu serin pada bagian sisi aktifnya yang berperan dalam proses katalisis (Whitaker, 1994:472). Enzim ini mampu menghidrolisis peptida (protein) pada C-terminal/karboksil dari residu asam amino dasar, yaitu lisin dan arginin. Selain itu, amida dan ester juga dapat dihidrolisis oleh tripsin walaupun tidak semudah menghidrolisis peptida (Harrow and Mazur, 1962:133; dan Mathews and van Holde, 1990:355) (lihat Tabel 2.2).

Dalam sistem pencernaan, tripsin disekresikan oleh pankreas dalam bentuk proenzimnya, tripsinogen, ke dalam usus (*duodenum*). Tripsinogen diaktifkan di dalam *duodenum* oleh enzim lain, enterokinase dan bila sudah terbentuk tripsin maka pengaktifan tripsinogen juga dilakukan oleh tripsin (Harrow and Mazur, 1962:132). Sumber alami tripsin diperoleh dari sapi, babi, kelinci dan beberapa jenis mikroorganisme pada bagian organ pankreas dan susu (Schomburg dan Salzmann, Eds., 1991).

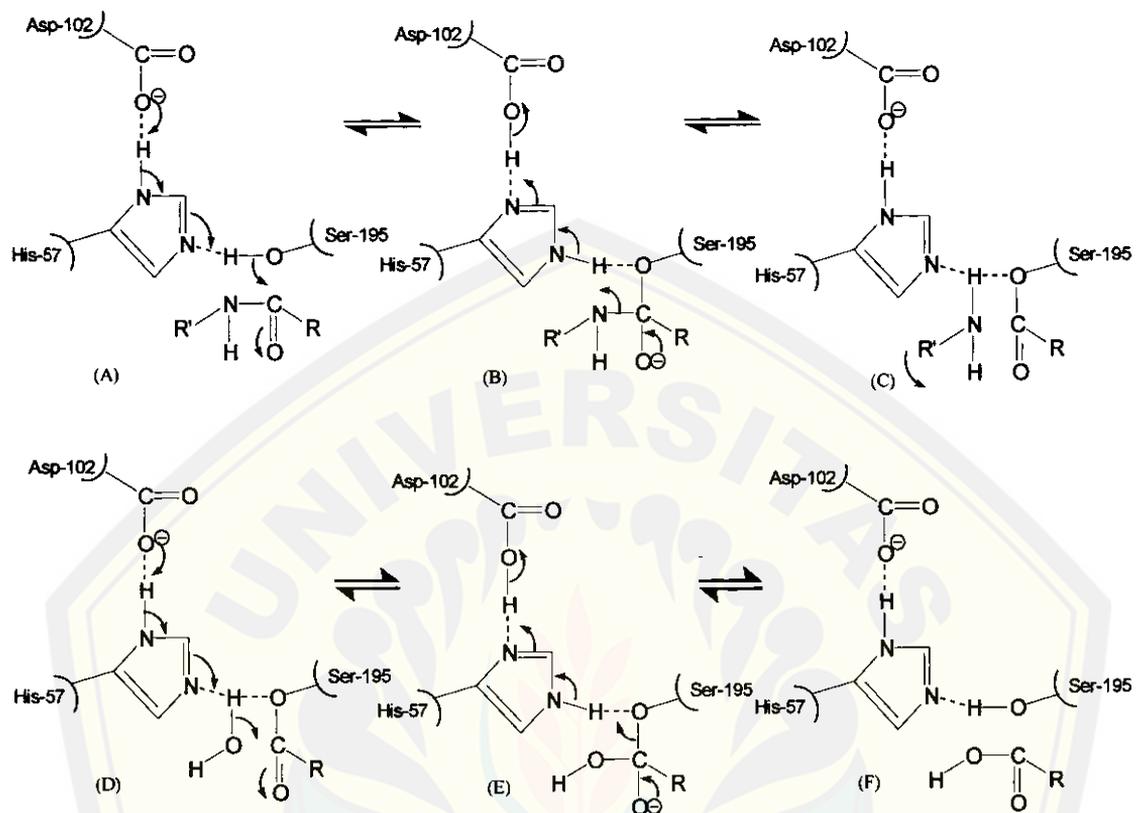
Katalisis yang dilakukan oleh tripsin dapat dijelaskan berdasarkan mekanisme katalisis asam/basa seperti halnya enzim protease serin lainnya (Voet and Voet 2004:496-507) dan mirip dengan mekanisme reaksi yang dilakukan oleh kimotripsin, hanya dibedakan oleh beberapa residu asam amino yang berperan dalam *pocket* sisi aktif enzim (Whitaker, 1994:474). Residu asam aspartat yang terdapat dalam *pocket* sisi aktif tripsin berperan dalam membentuk ikatan elektrostatik dengan substrat yang akan dihidrolisis (Drauz and Waldmann, Eds., 1995: 433).

c. Kimotripsin

Kimotripsin terdapat dalam sistem pencernaan (duodenum) yang dihasilkan oleh adanya pengaktifan kimotripsinogen (proenzim kimotripsin yang disekresikan oleh pankreas) oleh aktivitas tripsin (Harrow and Mazur, 1962:132). Jenis kimotripsin yang telah ditemukan pada beberapa hewan dikelompokkan menjadi beberapa nama, yaitu: kimotripsin A (EC. 3.4.4.6), kimotripsin B (EC. 3.4.4.5) dan kimotripsin C (3.4.21.1) yang memiliki sifat katalisis yang mirip (Schomburg dan Salzmann, Eds., 1991). Kimotripsin yang telah dapat diisolasi diperoleh dari beberapa organisme, yaitu: ayam babi, sapi, ikan salmon dan anjing (Schomburg dan Salzmann, Eds., 1991).

Kimotripsin merupakan protease yang menghidrolisis rantai polipeptida pada bagian tengah rantai (endopeptidase) dan tergolong dalam golongan protease serin (Whitaker, 1994:472). Enzim ini mampu menghidrolisis rantai peptida/protein pada sisi C-terminal/karboksil residu asam amino aromatik (Harrow and Mazur, 1962:133), seperti: tirosin, triptofan, fenilalanin, metionin dan leusin (Daflin, 1997:1071; dan Mathews and van Holde, 1990:146).

Reaksi katalisis oleh kimotripsin dapat dijelaskan dengan mekanisme katalisis asam-basa (lihat Gambar 2.8). Tahapan reaksi katalisis dapat dibagi menjadi 2, yaitu; tahap asilasi dan tahap deasilasi. Tahap asilasi diawali dengan pembentukan kompleks adsorbtif stereospesifik antara substrat dan enzim (struktur B) yang terjadi



Tahap asilasi antara (A) – (B) dan tahap deasilasi antara (C) – (F)
Gambar 2.8 Mekanisme Katalisis Kimotripsin

ketika terdapat substrat di dekat sisi aktif enzim. Kemudian gugus imidazol residu histidil-57 berperan sebagai basa untuk memotong ikatan O-H pada gugus hidroksil residu seril-195. Pada saat yang bersamaan, terjadi serangan nukleofil oksigen dari residu seril-195 pada karbonil substrat untuk memudahkan proses pemotongan ikatan O-H tersebut. Dari tahap asilasi ini diperoleh gugus R' yang terpisah dari substrat dan terbentuk asilenzim (struktur C) (Whitaker, 1994:479).

Setelah terbentuk asilenzim, tahap deasilasi dimulai. Tahap ini diawali dengan pemindahan proton dari air ke gugus imidazol yang berfungsi sebagai basa untuk memudahkan serangan hidroksida pada gugus karbonil asilenzim (struktur D). Pada

tahap intermediet kedua (struktur E), imidazol berperan sebagai asam dalam deasilasi asilenzim untuk melepaskan produk kedua dan regenerasi enzim (struktur F). Peran residu histidil-57 sebagai basa (tahap asilasi) dan basa (tahap deasilasi) dimudahkan oleh adanya ikatan hidrogen dengan residu aspartil-102 (Whitaker, 1994:479).

2.6 Derajat Hidrolisis

Derajat hidrolisis merupakan parameter umum yang digunakan untuk menggambarkan hasil proses dan indikator terjadinya proses hidrolisis (Diniz and Martin, 1996). Derajat Hidrolisis (%DH) menyatakan tingkat pemotongan peptida dalam reaksi hidrolisis protein oleh asam, basa ataupun enzim protease. Nilainya dapat ditentukan dengan menggunakan metode titrasi formol. Melalui metode ini, hasil reaksi hidrolisis protein ditentukan jumlah ujung α -amino-nya yang menggambarkan jumlah ikatan peptida terhidrolisis (h) dan komposisi asam amino dalam protein yang menggambarkan jumlah ikatan peptida dalam protein (h_{tot}) untuk hidrolisis sempurna. Selanjutnya %DH dapat ditentukan sebagai rasio jumlah ikatan peptida terhidrolisis (h) dan jumlah total ikatan peptida dalam protein (h_{tot} , m_{eq}/kg protein).

$$\%DH = \left(\frac{h}{h_{tot}} \right) \cdot 100$$

(Sudarmaji dkk., 1989; Sudarmadji, dkk., 1997; Kristinsson and Rasco, 2000a).

2.7 Elektroforesis

Elektroforesis adalah salah satu cara analisis dan pemurnian protein melalui pemisahan protein atau asam nukleat (DNA dan RNA) yang berada dalam suatu campuran. Prinsip kerjanya didasarkan pada adanya muatan molekul dalam larutan yang dapat bergerak pada medan listrik. Jika suatu larutan yang mengandung protein diposisikan pada medan listrik, maka protein tersebut akan bermigrasi dengan laju yang bergantung dengan kekuatan medan, muatan dan koefisien gesekan.

Berdasarkan hal itu maka teknik elektroforesis dilakukan untuk pemisahan protein atau enzim yang berada pada suatu larutan (Stryer, 2000).

Sebelum protein dipisahkan berdasarkan massanya melalui elektroforesis gel akrilamida, campuran protein dilarutkan dalam *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE), yaitu suatu deterjen anorganik yang akan memutuskan hampir semua interaksi kovalen dalam protein alami. Selain itu merkaptoetanol disertakan untuk mereduksi ikatan sulfida yang terdapat pada protein. Pada kompleks SDS-protein terdenaturasi ini kemudian dilakukan elektroforesis dalam gel poliakrilamida sebagai lempeng tegak lurus. Arah elektroforesis dari atas ke bawah. Setelah terjadi pemisahan, protein dalam gel dapat divisualisasi setelah diberikan pewarnaan dengan zat pewarna seperti *coomassie brilliant blue* (CBB) sehingga akan tampak seperti pita-pita (Stryer, 2000).



BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Pelaksanaan

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April 2007 sampai Februari 2008 di Laboratorium Kimia Organik dan Biokimia Jurusan Kimia FMIPA Universitas Jember.

3.2 Sampel Penelitian

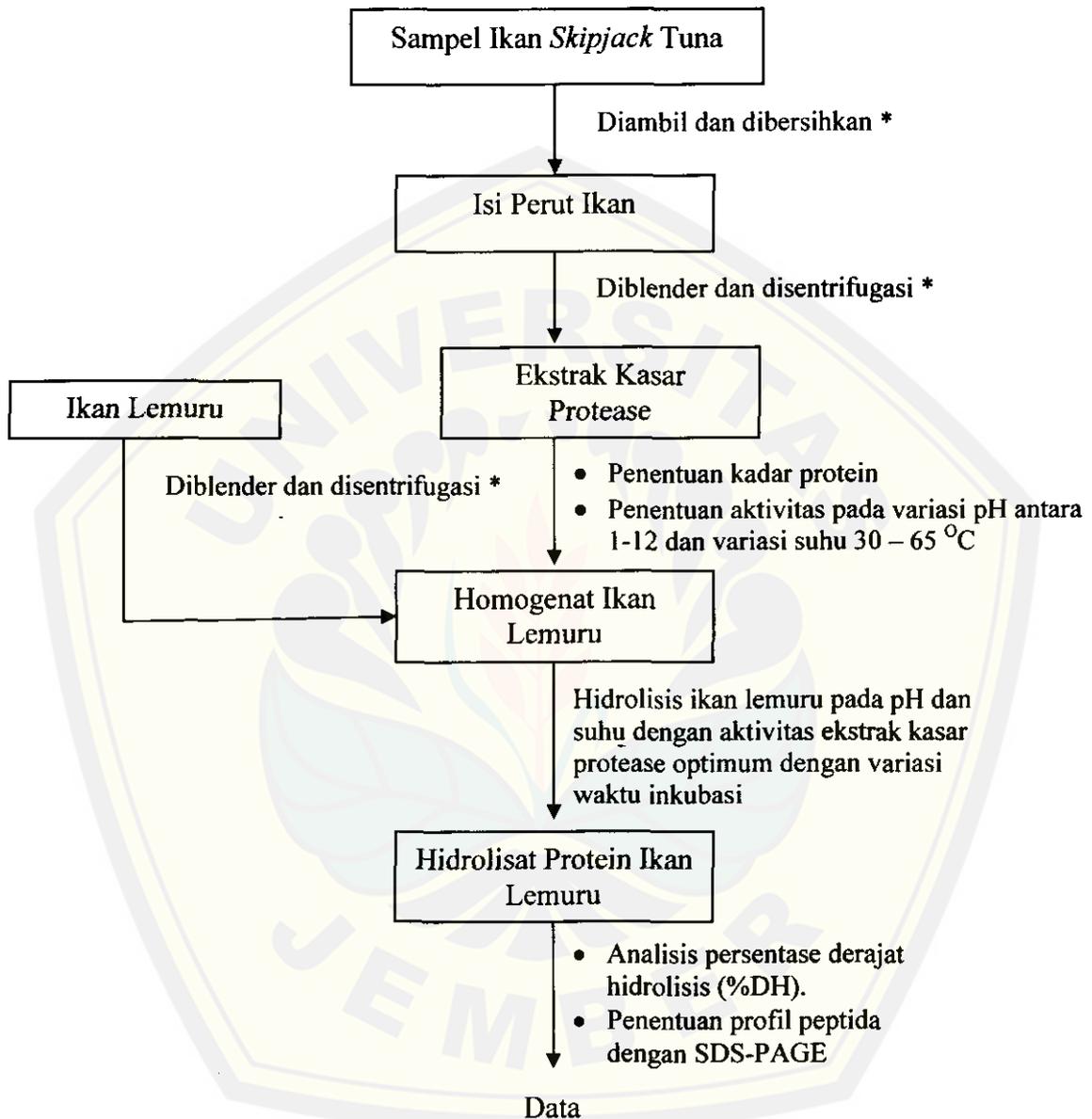
Sampel ikan *skipjack* tuna dan ikan lemuru yang digunakan diperoleh dari tempat pelelangan ikan. Ikan-ikan tersebut disimpan pada suhu $< 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama dibawa dari tempat pelelangan menuju ke laboratorium, sehingga ikan yang digunakan berada dalam keadaan beku.

3.3 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan adalah beberapa jenis alat ukur gelas (pipet ukur, pipet volume, labu ukur, gelas ukur, buret), neraca analitik, termometer, blender, sentrifuge, spektrofotometer uv-vis, penangas es, *water bath*, *freezer*, pH-meter, *box* pendingin dan peralatan bantu gelas (erlenmeyer, beaker glass).

Bahan ikan *Skip jack* tuna dan ikan lemuru yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari pelelangan ikan. Bahan-bahan lainnya adalah kasein 1% (w/v) dalam air, buffer KCl-HCl 0,1 M (pH 1 dan 2), buffer sirat 0,2 M (pH 3 dan 4), buffer fosfat 0,2 M (pH 5 dan 6), buffer tris-HCl 0,1 M (pH 7, 8, 9, 10, 11 dan 12), larutan K-oksalat jenuh (K-oksalat : akuades = 1 : 3), larutan NaCl 1%, larutan formaldehida 40%, larutan NaOH 0,1 N dan 3 N, larutan HCl 6 N, indikator fenolftalein (PP) 1%, larutan standar tirosin dan larutan *trichloroacetic acid* (TCA) 12% (w/v). Bahan-bahan untuk SDS-PAGE.

3.4 Rancangan Penelitian



* Dilakukan pada suhu 4-10 °C.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Isolasi Protease dari Ikan *Skipjack* Tuna (*Katsuwonus pelamis*)

Ikan *Skipjack* Tuna segar dibelah perutnya dan diambil bagian lambung dan ususnya, selanjutnya dicuci dengan air mengalir. Lambung dan usus dipotong-potong, ditimbang dan ditambah aquades dingin (0-2°C) dengan perbandingan 1:3 (g/mL), selanjutnya dihomogenasi dengan cara diblender pada suhu 4-10°C selama 3-5 menit. Homogenat yang diperoleh disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm pada 4°C selama 20 menit. Endapan/pelet hasil sentrifugasi dibuang dan supernatannya digunakan sebagai ekstrak kasar protease (Chong, *et al.*, 2002).

3.5.2 Penentuan Kadar Protein Ekstrak Kasar Protease

Kadar protein ekstrak kasar protease ditentukan menggunakan metode kjehdahl (Soedarmadji, 1997:67-68). Sebanyak 0,1 g CuSO₄ dan 0,8 g K₂SO₄ dimasukkan labu destruksi dan ditambahkan kedalamnya sebanyak 2 mL ekstrak kasar protease dan 5 mL H₂SO₄ pa. Selanjutnya campuran tersebut dipanaskan sampai terbentuk larutan bening kehijauan dan asap putih yang dihasilkan habis. Larutan hasil destruksi didinginkan dan ditambah dengan NaOH 40% hingga berwarna coklat kehitaman. Selanjutnya didestilasi sampai volume larutan penampung (HCl 0,1 M) menjadi 2-3 kali volume awal. Setelah proses destilasi selesai, larutan penampung dititrasi dengan larutan NaOH 0,1 M yang sebelumnya telah ditambahkan kedalamnya sebanyak 3 tetes indikator PP 1% sampai berwarna pink.

3.5.3 Penentuan Aktivitas Total Protease

Aktivitas protease ditentukan menggunakan protein standar kasein pada pH 1-12 dan suhu 50°C. Campuran 0,3 mL substrat 1% (w/v), 0,7 mL buffer dan 0,1 mL ekstrak kasar protease diinkubasi dalam *water bath* selama 15 menit pada suhu 50°C. Reaksi dihentikan dengan penambahan 0,5 mL larutan TCA (12% w/v) ke dalam campuran tersebut. Kemudian campuran dibiarkan selama 1 jam pada suhu 4°C dan

dilanjutkan dengan sentrifugasi pada 8000 rpm selama 15 menit. Selanjutnya volume supernatan yang didapatkan dijadikan 10 mL. Jumlah tirosin yang dihasilkan ditentukan dengan mengukur absorbansi supernatan pada $\lambda = 280$ nm, yang merupakan serapan protein dengan asam amino aromatik (Chong, *et al.*, 2002).

Larutan blanko dibuat dengan menginkubasi campuran 0,1 mL ekstrak kasar protease, 0,7 mL buffer dan 0,5 mL TCA 12% selama 15 menit pada suhu 50° C yang diikuti penambahan 0,3 mL substrat. Kemudian campuran diperlakukan sama seperti prosedur sampel.

Aktivitas total protease juga diukur pada variasi suhu 35-65°C pada pH optimum, dengan prosedur yang sama dengan penentuan aktivitas protease pada variasi pH.

3.5.4 Hidrolisis Ikan Lemuru

Sebanyak 90 g ikan lemuru yang telah dibuang sisik, kepala, isi perut, dan tulangnya ditambah air 1:3 (g/mL), diblender sampai halus menjadi homogenat. Selanjutnya disentrifuge untuk memisahkan lemak dan minyaknya yang berada di bagian atas. Supernatan dan pelet dihomogenkan, selanjutnya dikondisikan pH dan temperatur optimum hidrolisis yang diinginkan. Pengkondisian pH dengan penambahan HCl 1 M atau NaOH 1 M sesuai kondisi yang dikehendaki. Setelah tercapai kondisi yang diinginkan, kedalamnya ditambahkan ekstrak kasar protease sebanyak 20 mL dan diinkubasi. Sebagai kontrol, homogenat daging lemuru diperlakukan sama akan tetapi tanpa penambahan crude protease.

Hidrolisis dilakukan dengan memvariasi waktu inkubasi. Setelah inkubasi selama 5 menit, hidrolisat diambil sebagian dan dimatikan enzimnya, empat bagian yang lain dihidrolisis lanjut dengan menjaga pH dan suhu optimum. Setiap pengambilan HPI pada interval yang telah ditentukan, homogenat yang dihidrolisis lanjut diukur pH dan suhunya. Jika pH atau suhu berubah, maka dikondisikan kembali ke kondisi optimum. Penghentian reaksi hidrolisis dilakukan dengan

pemanasan campuran pada suhu 90°C selama 15 menit. Campuran disentrifugasi 3500 rpm selama 20 menit untuk memisahkan fraksi minyak, padat dan air. Proses tersebut diulang kembali setelah interval waktu inkubasi selama 30, 60, 120 dan 180 menit. Supernatan dari hasil sentrifugasi HPI disaring untuk lebih memperkecil keberadaan lipid sebagai pengotor. Filtrat HPI lemuru dibagi menjadi dua bagian, satu bagian dititrasi formol untuk penentuan derajat hidrolisis (%DH), satu bagian yang lain dikeringkan dengan evaporasi vakum untuk mengetahui kadarnya.

3.5.5 Penentuan Derajat Hidrolisis (%DH)

Derajat hidrolisis (%DH) HPI lemuru ditentukan menggunakan metode titrasi formol (Sudarmadji, dkk., 1997).

a. Penentuan Ikatan Peptida Terhidrolisis, h

Sebanyak 4 mL larutan HPI diencerkan menjadi 50 mL, selanjutnya diambil 10 mL ditambah dengan 20 mL NaCl 1% dan diaduk hingga homogen selama 5 menit. Kemudian larutan ditambah dengan 0,5 mL K-oksalat dan 1 mL indikator fenoltalein (PP) yang dilanjutkan dengan titrasi menggunakan NaOH 0,1 N sampai berwarna merah muda. Setelah tercapai titik akhir titrasi, titrat ditambah dengan formaldehida 40% sebanyak 2 mL dan proses titrasi dilanjutkan kembali sampai berwarna merah muda. Sebagai larutan blanko, digunakan akuades menggantikan larutan HPI dan diperlakukan sama.

b. Penentuan Ikatan Peptida Total Protein, h_{tot}

Sebanyak 0.035 g HPI lemuru kering dimasukkan dalam botol hidrolisis, selanjutnya ditambah dengan 1.9 mL akuades dan 2 mL HCl pekat (11,7 N). Botol ditutup rapat dan diinkubasi pada suhu 110°C selama 18 jam. Selanjutnya, sisa HCl dinetralkan dengan penambahan 3,9 mL NaOH 6 N dan volume larutan dijadikan 10 mL. Kemudian, larutan yang dihasilkan ditambah 0,5 mL K-oksalat dan 1 mL indikator fenoltalein (PP) serta dilanjutkan dengan titrasi menggunakan NaOH 0,1 N sampai berwarna merah muda. Setelah tercapai titik akhir titrasi, titrat ditambah

dengan formaldehida 40% sebanyak 2 mL dan proses titrasi dilanjutkan kembali sampai larutan titrat berwarna merah muda. Sebagai larutan blanko, digunakan akuades menggantikan larutan HPI dan diperlakukan sama.

3.5.6 Elektroforesis HPI Lemuru

HPI lemuru dielektroforesis dengan SDS-PAGE (Bollag *et al.*, 1996).

Formulasi gel bawah (Lampiran) diinjeksikan kedalam alat pencetak gel yang telah dirangkai sebanyak 3/4 volume pencetak. Selanjutnya ditambahkan aquadimen pada bagian atasnya untuk mempercepat pematangan gel dan didiamkan selama 45-60 menit. Setelah gel bawah memadat, aquadimen dikeringkan dan permukaan gel bagian atas dicuci dengan aquadimen. Selanjutnya formulasi gel atas (Lampiran) diinjeksikan sampai memenuhi sisa ruang dalam pencetak dan dengan cepat sisir pencetak sumur dipasang. Setelah gel atas memadat (30-45 menit), sumur gel dicuci dengan aquadimen dan dikeringkan dengan kertas saring.

Sebanyak 30 μ L larutan sampel HPI yang telah terdenaturasi (lihat Lampiran F.4), diinjeksikan kedalam sumur gel. Selanjutnya, perangkat alat tempat gel dipasang kedalam kompartemen *running*. Kompartemen diisi dengan buffer *running* (Lampiran), selanjutnya ditutup dan dihubungkan dengan kutub negatif (katoda) dan positif (anoda) *power supply*. Setelah semua perangkat terpasang, alat dihubungkan dengan tegangan 100,0 V (konstan). Elektroforesis berakhir apabila warna biru *tracking dye* telah mencapai sekitar 0,5 cm dari bagian bawah gel bawah, berkisar 120 menit. Selanjutnya, gel dilepas dari perangkatnya dan diwarnai dengan larutan staining (Lampiran) sambil digoyang menggunakan *shaker* selama 12-18 jam. Gel yang telah terwarnai dicuci dengan larutan *destaining* (Lampiran) untuk membersihkan pewarna yang tidak terikat pada gel sampai pita-pita terlihat jelas.

3.6 Metode Analisis Data

Setiap pengukuran dilakukan sebanyak 3 kali ulangan dan dianalisis tingkat signifikan hasil penelitian dengan menghitung standar deviasi (SD) dan relatif standar deviasinya, yaitu dengan rumus:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x_i - x_r)^2}{n-1}} \quad RSD = \frac{SD}{x_r}$$

Keterangan:

x_i = hasil pengukuran setiap ulangan

x_r = rata-rata hasil pengukuran

n = jumlah ulangan

Derajat hidrolisis (%DH) ditentukan dari hasil titrasi formol dengan rumus:

$$\%DH = \frac{h}{h_{tot}} \times 100\%$$

$$h = \frac{(V_{sampel} - V_{blanko}) \times M_{NaOH} \times f_p}{10 \times konsentrasiHPI}$$

$$h_{tot} = \frac{(V_{sampel} - V_{blanko}) M_{NaOH}}{massaHPI}$$

Keterangan:

h = Jumlah ikatan peptida yang terhidrolisis

h_{tot} = Jumlah total ikatan peptida dalam protein atau jumlah total asam amino protein

V_{sampel} = Volume NaOH yang dibutuhkan untuk titrasi larutan HPI

V_{blanko} = Volume NaOH yang digunakan untuk titrasi blanko, blanko adalah larutan HPI yang diganti dengan air.

M_{NaOH} = Konsentrasi NaOH

f_p = Faktor pengenceran larutan HPI



BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4. 1. Ekstrak Kasar Protease dari Isi Perut Ikan *Skipjack* Tuna

Protease merupakan suatu kelompok enzim yang dapat menghidrolisis ikatan peptida pada protein menjadi oligopeptida dan asam-asam amino. Protease dapat dijumpai di dalam sel organisme, baik hewan, tumbuhan dan mikroba. Protease dari hewan dapat dijumpai di dalam organ pencernaan karena merupakan tempat untuk menghidrolisis protein dari makanan.

Protease dalam penelitian ini diperoleh dari isi perut ikan *skipjack* tuna (gambar 4.1) pada bagian usus dan lambung. Ikan *skipjack* tuna dipilih sebagai sumber protease karena merupakan jenis ikan karnivora yang memakan ikan lain termasuk ikan lemuru. Dengan demikian diharapkan protease dari ikan *skipjack* tuna dapat menghidrolisis protein ikan lemuru dengan baik. Selain alasan tersebut, ikan *skipjack* tuna merupakan salah satu jenis ikan yang banyak digunakan sebagai bahan baku industri pengalengan ikan. Industri ini menghasilkan limbah berupa kepala dan isi perut ikan tuna. Selama ini, limbah tersebut hanya digunakan sebagai bahan baku pakan ternak sehingga memiliki nilai ekonomis rendah. Untuk meningkatkan nilai ekonomisnya, dalam penelitian ini diupayakan untuk memanfaatkan limbah tersebut sebagai sumber protease dalam pembuatan hidrolisat protein ikan (HPI).



Gambar 4.1. Ikan *Skipjack* Tuna (*Katsuwonus pelamis*)

Protease dapat diperoleh melalui proses penghancuran jaringan sampel dengan blender dan proses pemisahan dengan sentrifuge. Pelarut yang digunakan dalam pemblenderan isi perut adalah aquades (Klomklao *et al.*, 2004). Perbandingan isi perut dengan air yang digunakan untuk mendapatkan ekstrak kasar protease yang bening adalah 1:3 (w/v). Aquades yang digunakan bertemperatur antara 0-2°C, bertujuan untuk mengurangi kenaikan temperatur selama proses pemblenderan sehingga kemungkinan untuk terjadinya denaturasi pada protease dapat diminimalkan.

Dalam proses pemisahan, kecepatan sentrifugasi yang digunakan sebesar 10000 rpm dengan suhu sentrifuge 4°C selama 20 menit (Chong, *et al.*, 2002), sehingga digunakan sentrifuge dingin (*refrigerate sentrifuge*). Proses sentrifugasi dengan kecepatan tersebut bertujuan untuk memisahkan partikel-partikel seperti organel sel, protein jaringan dan pengotor lain dari protease. Sampel yang telah disentrifugasi menghasilkan dua fraksi yaitu fraksi endapan/pelet dan supernatan. Dari proses sentrifugasi, protease akan berada dalam fraksi supernatan, sedangkan sebagian besar protein jaringan dan komponen lainnya berada dalam fraksi endapan/pelet. Selanjutnya, fraksi supernatan dipisahkan dari fraksi endapan dengan cara dekantasi. Protease terdapat di dalam supernatan karena merupakan protein globular yang larut dalam air. Supernatan tersebut kemudian disebut sebagai ekstrak kasar protease.

Suhu merupakan faktor penting yang harus dijaga dalam proses isolasi ekstrak kasar protease. Suhu yang digunakan adalah sekitar 4°C. Suhu rendah tersebut mutlak diperlukan untuk menurunkan aktivitas protease sehingga dapat meminimalkan terjadinya autolisis dan menurunkan aktivitas bakteri yang dapat merusak protease.

Ekstrak kasar protease yang dihasilkan pada penelitian ini memiliki performa berwarna kuning kecoklatan (gambar 4.2).



Gambar 4.2. Ekstrak kasar protease dari isi perut ikan *Skipjack* Tuna.

4. 1. Kadar Protein Ekstrak Kasar Protease

Penentuan kadar protein dari ekstrak kasar protease diperlukan untuk mengetahui aktivitas spesifik dari ekstrak kasar protease. Kadar protein ekstrak kasar protease dapat diketahui dengan menentukan N-nya menggunakan metode Kjeldahl (Sudarmaji, 1997). Prinsip kerja metode Kjeldahl adalah penguraian protein menggunakan asam pekat (H_2SO_4 pa) dan pemanasan ($\pm 400^{\circ}C$) menjadi amonia (NH_3) yang terlarut. Amonia tersebut, selanjutnya didestilasi dan ditampung dalam sejumlah tertentu asam encer. Sisa asam yang tidak bereaksi dengan amonia dititrasi dengan basa, basa yang diperlukan dalam titrasi sebanding dengan kadar N. Jika kadar N suatu bahan diketahui, maka dapat digunakan menentukan kadar proteinnya.

Penentuan protein suatu bahan dilakukan dengan mengalikan kadar N bahan dengan faktor perkalian 6,25. Faktor konversi tersebut berdasarkan hasil penelitian dan pengamatan bahwa protein alamiah mengandung unsur N rata-rata 16% (dalam protein murni) (Sudarmadji dkk., 1989).

Hasil pengukuran yang telah dilakukan menunjukkan kadar protein dalam ekstrak kasar protease dari isi perut ikan *skipjack* tuna sebesar 5.5 mg/mL (Lampiran A). Ekstrak kasar protease yang didapatkan masih merupakan campuran dari berbagai protein sehingga kadar protein tersebut bukan hanya berasal dari protease, akan tetapi juga dari protein lain.

4. 2. Aktivitas Spesifik Ekstrak Kasar Protease pada Variasi pH

Ekstrak kasar protease mampu menghidrolisis ikatan peptida dalam suatu protein sehingga menghasilkan campuran asam amino ataupun polipeptida yang lebih pendek. Setiap jenis protease bekerja optimum pada kondisi pH dan suhu serta pola reaksi pemotongan yang spesifik. Uji aktivitas perlu dilakukan untuk mengetahui adanya aktivitas dari ekstrak kasar protease yang berhasil terekstrak dari sampel isi perut ikan.

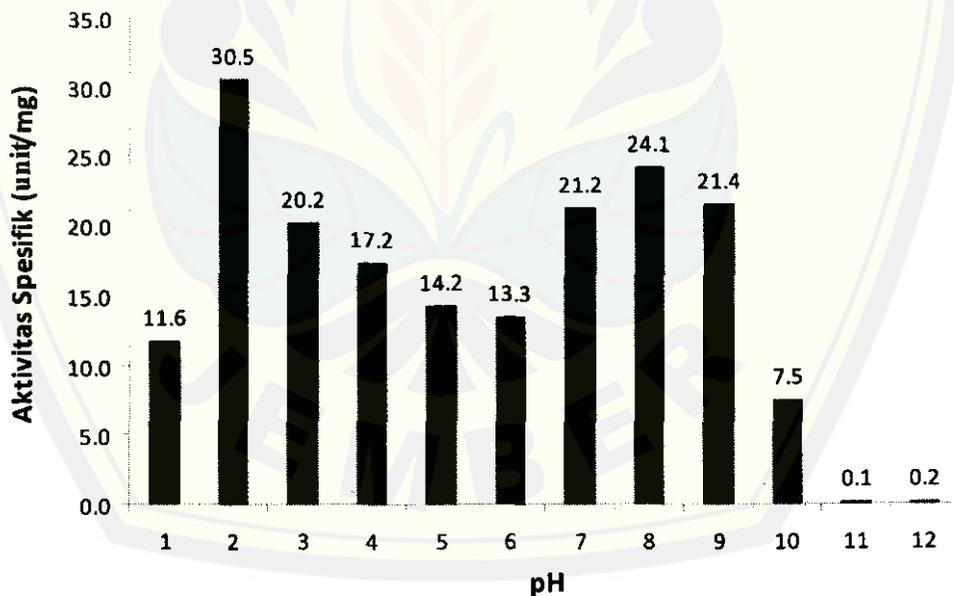
Uji aktifitas ekstrak kasar protease dilakukan menggunakan substrat universal kasein dan tidak menggunakan substrat spesifik karena tidak diketahui secara spesifik enzim-enzim yang terdapat di dalam ekstrak kasar. Kasein sebagai substrat akan terhidrolisis menjadi asam-asam amino, salah satunya yaitu tirosin. Tirosin merupakan target pemotongan dari pepsin dan kimotripsin. Ekstrak kasar protease mula-mula di uji aktifitasnya terhadap substrat universal kasein pada berbagai pH reaksi untuk mendapatkan pH optimum.

Tingginya aktivitas diukur dengan menghitung banyaknya tirosin yang dihasilkan selama proses hidrolisis. Penentuan jumlah tirosin dilakukan secara spektroskopi dengan membandingkan absorbansi sampel dengan larutan tirosin standar pada $\lambda = 280$ nm (Chong, *et al.*, 2002). Tirosin menyerap panjang gelombang 280 nm karena merupakan daerah penyerapan dari gugus aromatik yang terdapat pada tirosin. Absorbansi Larutan Standar Tirosin pada $\lambda = 280$ nm digunakan untuk menghitung ekivalen tirosin yang dihasilkan pada hidrolisis kasein oleh Ekstrak kasar protease dengan bantuan kurva kalibrasi (Lampiran B). Oleh sebab itu, aktifitas proteolitik ekstrak kasar dinyatakan dalam ekivalen $\mu\text{g/mL}$ tirosin.

Dengan mengukur besarnya protein total dalam Ekstrak kasar protease, maka dapat dihitung aktifitas spesifik dari ekstrak kasar protease dari isi perut ikan *skipjack* tuna, yaitu aktifitas proteolitik ekstrak kasar untuk setiap gram enzim (protein) yang terdapat dalam Ekstrak kasar. Aktifitas spesifik dapat dinyatakan dalam ekivalen μg tirosin yang dihasilkan dalam setiap menit reaksi hidrolisis untuk setiap mg protein

enzim yang ada dalam ekstrak kasar protease. Semakin besar nilai aktifitas spesifiknya, maka makin efektif ekstrak kasar enzim tersebut melakukan hidrolisis.

Aktifitas ekstrak kasar protease dari isi perut *Skipjack* tuna terhadap substrat kasein dinyatakan dalam ekivalen μg tirosin per mL per menit. Uji optimasi pH menggunakan variasi pH 1 hingga 12 pada suhu 50°C . Gambar 4.3 menunjukkan aktivitas ekstrak kasar protease dari ikan *skipjack* tuna. Dari gambar tersebut tampak bahwa aktivitas ekstrak kasar protease memiliki dua puncak, yaitu pH 2 di daerah asam dan pH 8 di daerah basa. Aktivitas ekstrak kasar protease meningkat pada pH 2 kemudian menurun pada pH 3 hingga pH 6. Selanjutnya aktivitas meningkat pada pH 7 dan mencapai aktivitas optimum pada pH 8. Pada pH 9 aktivitas ekstrak kasar menurun seiring dengan keadaan larutan yang semakin basa yaitu hingga pH 12 yang mendekati aktivitas nol.



Gambar 4.3. Pengaruh pH terhadap aktivitas spesifik ekstrak kasar protease ikan *skipjack* tuna (*Katsuwonus pelamis*).

pH merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi aktivitas ekstrak kasar protease. Pada pH optimum, baik di kedua sisi pH 2 ataupun pH 8, laju reaksi pada kedua sisi pH optimum mengalami penurunan yang dapat disebabkan oleh beberapa faktor. Faktor pertama yaitu, protease mengalami denaturasi akibat pH tinggi atau rendah. Pada saat protease mengalami denaturasi, aktivitas dari protease akan menurun atau bahkan dapat kehilangan aktivitasnya. Faktor kedua, protease memerlukan gugus-gugus amino yang terionisasikan pada gugus samping yang mungkin aktif hanya pada satu keadaan ionisasi. Faktor yang ketiga, substrat dapat memperoleh atau kehilangan proton dan reaktif hanya pada satu bentuk muatan (Page, 1997).

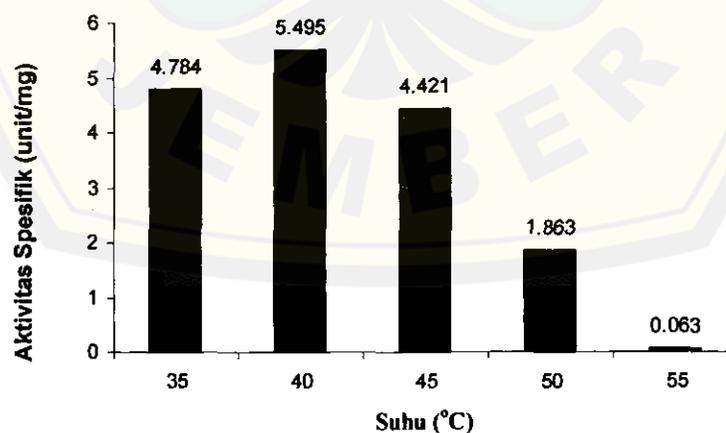
Ekstrak kasar protease dari isi perut ikan *skipjack* tuna memiliki dua pH optimum yaitu pada pH 2 dan pH 8, karena berasal dari lambung dan usus. Lambung memiliki pH asam (sekitar pH 2) yang menyebabkan protease di dalam lambung bekerja optimum pada pH 2. Usus memiliki pH basa yang menyebabkan protease di dalam usus ikan bekerja optimum di pH basa (sekitar pH 8). Aktivitas maksimum protease pada pH 2 mengindikasikan keberadaan dari protease asam yaitu pepsin. Hal ini sesuai dengan pernyataan Harrow dan Mazur (1962) yang menyatakan bahwa, pepsin terdapat dalam organ pencernaan vertebrata (lambung) yang disekresikan dalam bentuk proenzim (enzim yang tidak aktif) pada getah lambung, yaitu pepsinogen. Pengaktifan pepsinogen menjadi pepsin dilakukan dengan penambahan asam sampai pH 2. Pepsin stabil pada daerah pH 2-5 dengan kondisi optimum pada pH 2 dan akan kehilangan aktivitasnya pada daerah pH di atas 5 (Whitaker, 1994)

Daerah optimum pada pH 8 menunjukkan adanya aktivitas protease yang berasal dari usus yang memiliki lingkungan basa. Menurut Marks *et al.* (1996), ketika protein yang telah terdenaturasi masuk ke dalam lumen usus, pH usus meningkat yang disebabkan oleh sekresi bikarbonat dari pankreas eksokrin. Pada suasana tersebut, kimotripsin dan tripsin serta protease lain dari pankreas menjadi aktif. Aktivitas optimum pada pH basa (pada pH 8) mengindikasikan keberadaan tripsin dan kimotripsin pada ekstrak kasar protease dari isi perut ikan *skipjack* tuna. Menurut

Chong, *et al.* (2002) kimotripsin bekerja optimum di daerah pH 7,5-9,0 dan tripsin bekerja optimum di daerah pH 7-8 (Simon, *et al.*, 2001). Hal ini sesuai dengan hasil penelitian yang tampak pada gambar, dimana pada pH 7-9 aktivitas spesifik dari ekstrak kasar protease memiliki nilai yang tinggi.

4.3. Aktivitas Spesifik Ekstrak Kasar Protease pada Variasi Suhu

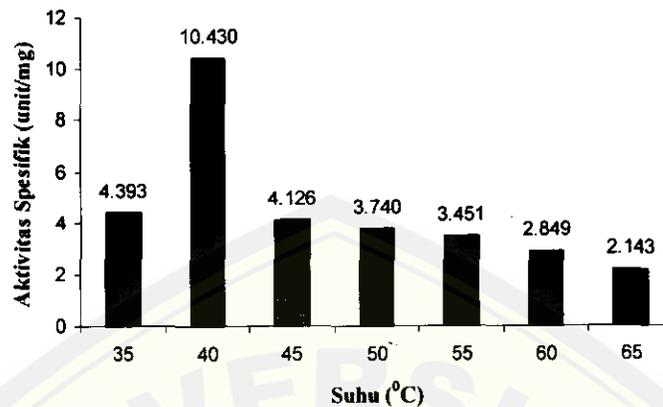
Pengujian aktivitas spesifik ekstrak kasar protease optimum pH 2 pada variasi temperatur 30°C hingga 55°C dengan interval 5°C mendapatkan hasil aktivitas optimum pada suhu 40°C (gambar 4.4). Suhu optimum yang didapatkan mendekati dengan kondisi tubuh ikan *skipjack* tuna di perairan hangat yaitu memiliki suhu tubuh 37,5°C (anonymous, 2008). Dari gambar grafik tersebut tampak terjadi kenaikan aktivitas seiring dengan peningkatan temperatur, selanjutnya setelah tercapai temperatur optimum (40°C), terjadi penurunan aktivitas secara drastis pada temperatur yang lebih tinggi. Kenaikan temperatur menyebabkan energi kinetik sistem hidrolisis meningkat sehingga interaksi protease dengan substrat semakin tinggi. Akibat yang ditimbulkan yaitu laju reaksi semakin naik sehingga aktivitas semakin tinggi sampai pada titik optimumnya. Pada temperatur yang lebih tinggi, penurunan aktivitas disebabkan oleh denaturasi protease.



Gambar 4.4. Pengaruh suhu terhadap aktivitas spesifik ekstrak kasar protease ikan *skipjack* tuna (*Katsuwonus pelamis*) pada pH 2.

Denaturasi protein merupakan suatu perubahan struktur sekunder, tersier dan quartener tanpa pemecahan ikatan-ikatan kovalen. Struktur-struktur protein tersebut dibentuk oleh interaksi-interaksi rantai polipeptida (ikatan ionik, ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik, dan jembatan disulfida). Interaksi-interaksi dalam polipeptida relatif labil, sehingga kenaikan suhu akan menyebabkan konformasi protein berubah. Pada protease, perubahan konformasi ini dapat mengakibatkan perubahan sisi aktif. Jika konformasi sisi aktifnya berubah, protease tidak akan mampu untuk mengikat substrat, akibatnya hidrolisis akan berhenti. Denaturasi protein juga dapat diikuti proses koagulasi (penggumpalan) molekul protein sehingga keluar dari larutannya (mengendap). Denaturasi pada protease tidak menutup kemungkinan juga diikuti koagulasi. Protease akan mengendap ketika terkoagulasi karena memiliki ukuran cukup besar.

Pengujian aktivitas spesifik ekstrak kasar protease protease optimum pH 8 pada variasi temperatur 30°C hingga 65°C dengan interval 5°C didapatkan hasil aktivitas optimum pada suhu 40°C (gambar 4.5). Berdasarkan profil grafik, aktivitas spesifik meningkat dengan drastis seiring dengan kenaikan temperatur sampai dicapai titik optimum (40°C), aktivitas spesifik pada suhu 40°C memiliki nilai yang jauh lebih tinggi dan dominan, selanjutnya terjadi penurunan aktivitas spesifik secara drastis. Kenaikan temperatur menyebabkan tripsin dan kimotripsin semakin aktif menghidrolisis. Akibatnya, semakin banyak substrat yang terhidrolisis sehingga aktivitas spesifik menanjak. Penurunan aktivitas pada temperatur yang lebih tinggi dari 40°C disebabkan oleh protease yang mulai terdenaturasi. Akibat denaturasi adalah konformasi kantong pengikatan spesifik di sisi aktif berubah sehingga kimotripsin ataupun tripsin tidak mampu mengikat substrat.



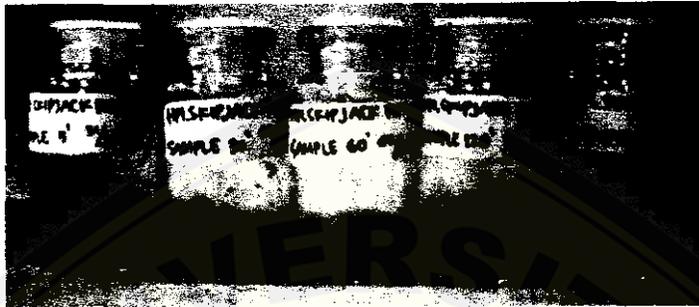
Gambar 4.5. Pengaruh suhu terhadap aktivitas spesifik ekstrak kasar protease ikan *skipjack* tuna (*Katsuwonus pelamis*) pada pH 8.

4. 4. Hidrolisis Protein Ikan Lemuru Menggunakan Ekstrak Kasar Protease

Berdasarkan hasil optimasi kondisi hidrolisis, maka hidrolisis ikan lemuru menggunakan ekstrak kasar protease dari isi perut ikan *skipjack* tuna dilakukan pada pH 2 dengan suhu 40°C dan pH 8 dengan suhu 40 °C. Dalam penelitian ini digunakan ekstrak kasar protease dari isi perut ikan *skipjack* tuna dengan perbandingan berat substrat (lemuru) dan volume Ekstrak kasar sebesar 20 mL/90 gram. Daging ikan lemuru yang digunakan merupakan daging lemuru yang telah dihancurkan dengan blender agar memudahkan enzim protease dalam menghidrolisisnya. Selanjutnya daging lemuru ditambahkan enzim protease. Dalam proses hidrolisis ini juga terdapat kontrol yaitu daging lemuru yang diperlakukan sama seperti sampel, baik kondisi suhu dan pH-nya, namun perbedaannya terletak pada penambahan ekstrak kasar protease pada daging ikan lemurnya, dimana pada kontrol tidak ditambahkan ekstrak kasar protease. Selama proses hidrolisis, sampel dan kontrol diukur pH-nya setiap 30 menit sekali. Hal ini bertujuan untuk menjaga kestabilan pH larutan sampel yang dihidrolisis.

Hasil dari proses hidrolisis yaitu hidrolisat protein ikan (HPI) tampak pada gambar 4.6 dan 4.7. Untuk HPI hasil hidrolisis pada pH 2 memiliki ciri fisik berwarna kuning kecoklatan, strukturnya berbentuk lembaran tipis dan kelarutan dalam air

relatif rendah. HPI hasil hidrolisis pada pH 8 memiliki ciri fisik berwarna kuning cerah, strukturnya berbentuk serbuk dan kelarutan dalam air relatif lebih tinggi dibandingkan kelarutan HPI hasil hidrolisis pada pH 2.



Gambar 4.6. Hidrolisat Protein Ikan Lemuru hasil hidrolisis dengan menggunakan ekstrak kasar protease dari *skipjack* tuna pada pH 2 dan suhu 40°C.



Gambar 4.7. Hidrolisat Protein Ikan Lemuru hasil hidrolisis dengan menggunakan ekstrak kasar protease dari *skipjack* tuna pada pH 8 dan suhu 40°C.

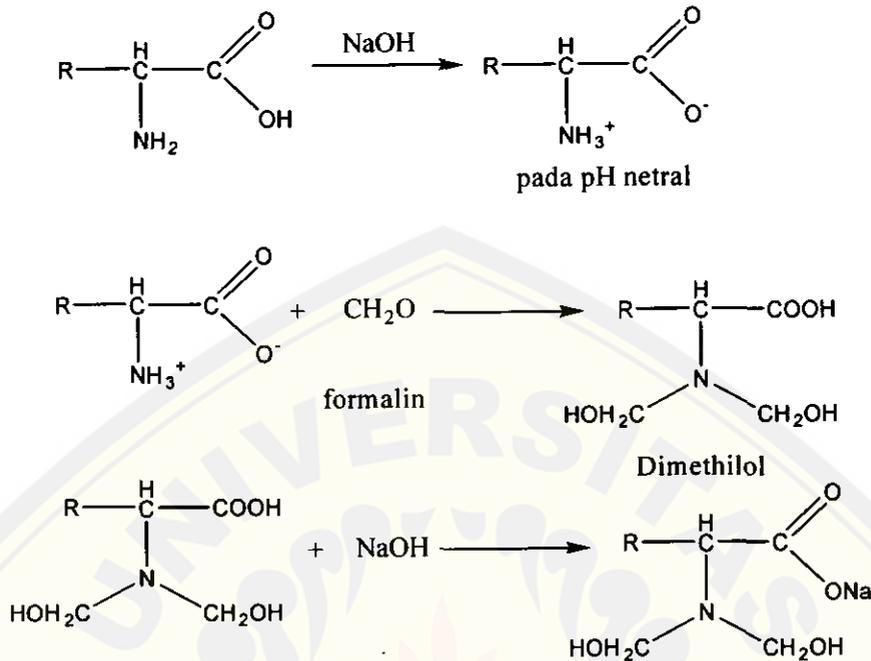
Perhitungan dalam titrasi formol HPI lemuru melibatkan kadar per mililiter HPI. Kadar protein per mililiter HPI diukur dengan cara mengeringkan larutan HPI menggunakan evaporasi vakum. Kadar dihitung melalui pembagian berat HPI kering dengan volume HPI yang dikeringkan (lampiran E.1). Kadar HPI yang didapatkan, baik kontrol maupun sampel dengan interval waktu inkubasi yang berbeda-beda tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan. Dengan demikian, dapat ditarik kesimpulan bahwa total protein terlarut dalam HPI sampel dan HPI kontrol dengan interval waktu inkubasi yang berbeda-beda relatif sama.

4.5. Derajat Hidrolisis HPI Lemuru

Derajat hidrolisis (DH) diukur menggunakan titrasi formol (Sudarmadji, 1989). DH merupakan persentase yang menyatakan tingkat pemotongan peptida dalam hidrolisis protein, baik oleh asam, basa ataupun enzim protease (Kristinsson and Rasco, 2000a). Nilai DH dapat ditentukan dengan membandingkan antara jumlah ikatan peptida terhidrolisis (h) yaitu hasil hidrolisis ekstrak kasar protease terhadap protein ikan lemuru, dengan jumlah total asam amino yang ada dalam protein (h_{tot}) lemuru. Jumlah total asam amino dalam protein ditentukan dengan menghidrolisis protein secara menyeluruh menggunakan HCl pekat.

Ikatan peptida total (h_{tot}) sama dengan jumlah asam-asam amino penyusun protein tersebut. HPI yang digunakan dalam penentuan h_{tot} adalah HPI kontrol terlarut yang sudah dikeringkan dengan evaporasi karena protein terlarutnya masih belum dihidrolisis oleh protease. Penghitungan h_{tot} dilakukan dengan menghidrolisis HPI kontrol menggunakan HCl 6 M. HPI yang dihidrolisis adalah 5 jenis kontrol asam dan 5 jenis kontrol basa. Hidrolisat yang dihasilkan, selanjutnya di tentukan jumlah asam aminonya dengan titrasi formol. Hasil penentuan jumlah asam amino HPI kontrol didapatkan sebesar 2,345 mmol/g (lampiran E1).

Prinsip pengukuran metode titrasi formol adalah penetralan larutan protein menggunakan asam (HCl) atau basa (NaOH), kemudian ditambahkan formalin membentuk dimethylol. Dengan terbentuknya dimethylol ini berarti gugus aminonya sudah terikat dan tidak akan mempengaruhi reaksi antara asam (ujung karboksilat) dengan basa NaOH (lihat Gambar 4.8). Fenolftalein ditambahkan sebagai indikator, akhir titrasi bila tepat terjadi perubahan warna menjadi merah muda yang konstan.



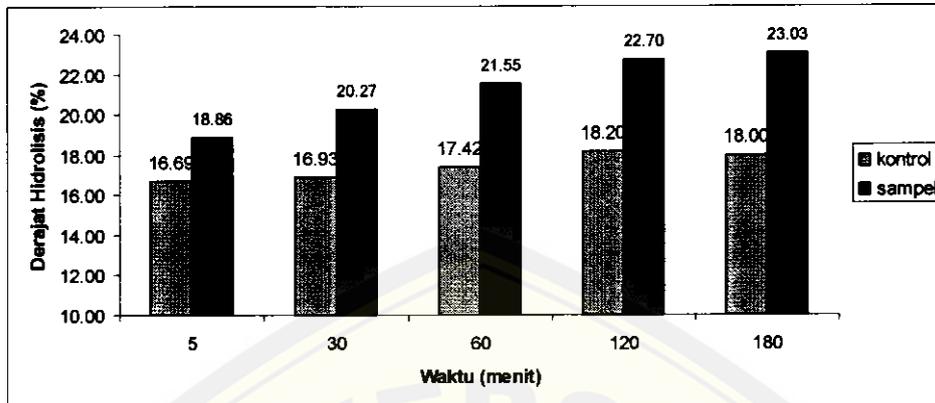
Sumber: Soedarmadji, 1989
Gambar 4.8 Reaksi titrasi formol

4.6.1 Derajat Hidrolisis HPI Lemuru, Hidrolisis Pada pH 2, 40°C

Profil derajat hidrolisis protein ikan lemuru yang diinkubasi pada pH 2 dan suhu 40°C dengan variasi waktu inkubasi ditampilkan secara grafis pada gambar 4.9.

Tabel 4.1. Nilai Rata-rata h dan %DH Protein Ikan Lemuru pada pH 2 dan Suhu 40°C.

Waktu (menit)	h (mmol/g)	%DH
5	0,4643	18.86
30	0,4643	20.27
60	0,4962	21.55
120	0,5024	22.70
180	0,5043	23.03



Gambar 4.9. Derajat hidrolisis lemuru pada pH 2 dan suhu 40°C.

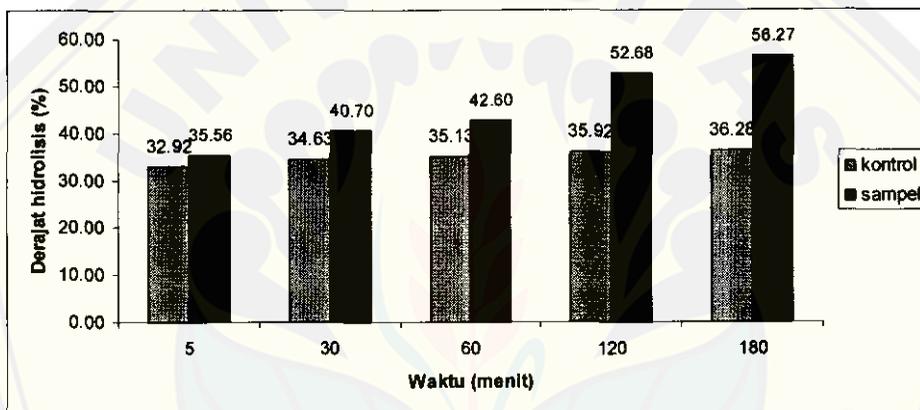
Derajat hidrolisis diukur hanya untuk hasil hidrolisis lemuru yang larut dalam air, sedangkan yang tidak larut dalam air tidak diukur. Gambar 4.9 menunjukkan bahwa derajat hidrolisis meningkat. Bila derajat hidrolisis pada waktu 5 menit dianggap sebagai awalnya, maka sangat jelas bahwa jumlah protein terlarutnya meningkat. Hal ini menunjukkan bahwa pepsin telah aktif menghidrolisis protein lemuru. Derajat hidrolisis masih memiliki kecenderungan untuk naik setelah menit ke 180 karena jika dilihat dari grafik, dari menit ke-5 hingga menit ke-180 derajat hidrolisisnya memiliki trend yang meningkat.

4.6.2 Derajat Hidrolisis HPI Lemuru, Hidrolisis Pada pH 8, 40°C

Nilai rata-rata h dan % DH yang diperoleh dari proses hidrolisis protein ikan lemuru oleh ekstrak kasar protease dari *skipjack* tuna diberikan pada tabel 4.2. Profil derajat hidrolisis HPI lemuru, hidrolisis pada pH 8, 40°C dengan variasi waktu inkubasi ditampilkan secara grafis (gambar 4.10).

Tabel 4.2. Nilai Rata-rata h dan %DH Protein Ikan Lemuru pada pH 8 dan Suhu 40°C.

Waktu (menit)	h (mmol/g)	%DH
5	35.55643	35.56
30	40.70433	40.70
60	42.59755	42.60
120	52.67619	52.68
180	56.26774	56.27



Gambar 4.10. Derajat hidrolisis lemuru pada pH 8 dan suhu 40°C.

Gambar 4.10 menunjukkan bahwa derajat hidrolisis meningkat selama proses hidrolisis. Pada waktu inkubasi 5 menit, tampak bahwa derajat hidrolisis sampel jauh berbeda dengan derajat hidrolisis kontrol. Hal ini menunjukkan sejak menit ke-5, tripsin dan kimotripsin telah aktif menghidrolisis protein ikan lemuru. Pada waktu inkubasi 120 menit hingga 180 menit tampak bahwa derajat hidrolisis meningkat tajam, hal ini menunjukkan bahwa reaksi enzimatik berjalan dengan cepat dimana protease berada dalam kondisi sangat aktif.

4. 6. Elektrofogram Hasil Hidrolisis Protein Ikan Lemuru oleh Ekstrak Kasar Protease Ikan *Skipjack* Tuna

Hidrolisat protein ikan (HPI) lemuru yang dihasilkan dari hidrolisis ikan lemuru dengan ekstrak kasar protease ikan *skipjack* tuna terhadap variasi waktu inkubasi selanjutnya dianalisis pita-pita proteinnya menggunakan metode SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) (Bollag *et al.*, 1996). Metode ini menghasilkan elektrofogram berupa pita-pita protein. Pembuatan gel elektroforesis SDS-PAGE yang terdiri dari gel atas (*stacking gel*) dan gel bawah (*separating gel*). Prinsip pemisahan protein pada gel elektroforesis yang diberi medan listrik dimana pergerakan tersebut didasarkan perbedaan muatan dan berat molekul protein. Protein yang akan dipisahkan ditambahkan SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) untuk mengubah struktur protein menjadi bentuk linier dan memberikan muatan negatif yang seragam. Penambahan merkaptoetanol berfungsi untuk mereduksi semua ikatan disulfida. Akrilamida dan bis-akrilamida merupakan komponen utama dalam pembuatan gel elektroforesis, dimana membentuk *cross linking* yang berfungsi untuk memisahkan protein. *Cross linking* yang terbentuk akan membentuk pori-pori yang nantinya dapat dilalui oleh protein selama *running* berlangsung. Besarnya pori-pori yang terbentuk tergantung dari perbandingan kedua bahan utama tersebut.



Gambar 4.11. Elektroforegram sampel hasil hidrolisis pada kondisi asam (pH 2) dan kontrol. C1 merupakan kontrol 5', C2 = kontrol 30', C3 = kontrol 60', C4 = kontrol 120', M = standar BSA. S1 = sampel 5', S2 = sampel 30', S3 = sampel 60', S4 = sampel 120' dan S5 = sampel 180'.

Dari elektroforegram hasil hidrolisis pada pH 2 (gambar 4.11) tampak bahwa terdapat perbedaan antara kontrol dan sampel. Perbedaan pertama terletak pada pita-pita di daerah kolom (a), pita-pita pada sumur-sumur kontrol lebih gelap/tebal dibandingkan dengan pita-pita pada sumur-sumur sampel. Hal ini menunjukkan bahwa protein yang terdapat pada kontrol memiliki ukuran yang lebih besar daripada sampel, sehingga protein tertahan di bagian atas gel, sedangkan pada sampel telah terjadi penurunan jumlah protein yang memiliki ukuran besar. Kedua, pada kolom (c) tampak pita-pita pada kolom kontrol memiliki pita-pita yang lebih sedikit dibandingkan sampel. Perbedaan ini menunjukkan bahwa pada sampel telah terjadi proses pemotongan ikatan peptida yang menghasilkan protein yang memiliki ukuran lebih kecil dibandingkan protein sebelum dihidrolisis. Akibatnya, protein-protein dengan ukuran kecil dapat melewati gel akrilamida hingga pada bagian bawah gel.

Pada kolom (a) dan (b) bagian sampel, elektroforegram pada sampel 5 menit (S1) hingga sampel 180 menit (S5) secara berturut-turut tampak bahwa pada pita elektroforegram warna yang terbentuk semakin pudar. Pada kolom (c), dari sampel 5

menit (S1) hingga sampel 180 menit (S5) secara berturut-turut, pita-pita yang terbentuk semakin banyak dan posisi pita semakin ke bawah dengan bagian atas yang semakin pudar. Hal ini menandakan bahwa telah terjadi pengurangan jumlah protein yang memiliki ukuran besar sehingga dapat lolos ke pori-pori akrilamid hingga pada bagian bawah. Hal tersebut menunjukkan bahwa telah terjadi hidrolisis protein ikan lemuru.

Berdasarkan pita pada kolom M (standar BSA), tampak bahwa pita-pita dari kontrol dan sampel terletak lebih rendah. Dari posisi pita tersebut menunjukkan bahwa protein HPI lemuru terlarut, baik kontrol ataupun sampel, massa molekulnya lebih kecil dibandingkan massa molekul BSA yang memiliki ukuran 66 kDa.



Gambar 4.12. Elektroforegram sampel hasil hidrolisis pada kondisi basa (pH 8) dan kontrol. C1 merupakan kontrol 5', C2 = kontrol 30', C3 = kontrol 60', C4 = kontrol 120', C5 = kontrol 180'. S1 = sampel 5', S2 = sampel 30', S3 = sampel 60', S4 = sampel 120' dan S5 = sampel 180'.

Elektroforegram pada gambar 4.12 merupakan elektroforegram hasil hidrolisis basa yaitu pada pH 8. Pada kolom (a), (b), (c) dan (d), elektroforegram pada sumur-sumur kontrol menghasilkan pita-pita yang hampir sama dan hanya memiliki beberapa pita. Sedangkan pada sampel pita-pita yang dihasilkan lebih banyak

dibandingkan kontrol. Pada kolom (a), pita-pita pada kontrol memiliki pita-pita yang tebal dan berwarna gelap yang mengindikasikan bahwa kontrol banyak mengandung ikatan-ikatan peptida yang lebih panjang atau memiliki molekul protein yang lebih besar dibandingkan sampel. Pada kolom yang sama, pita-pita pada sampel memiliki pita-pita yang lebih tipis dan berwarna lebih pudar dibandingkan dengan pita-pita pada kontrol. Pada kolom (a), sumur sampel 30 menit (S1) hingga sumur sampel 180 menit (S5) secara berturut-turut, tampak pada pita elektroforegram semakin memudar. Hal ini mengindikasikan bahwa pada sampel telah terjadi hidrolisis protein yaitu pemotongan ikatan peptida yang dalam penelitian ini pemotongan dilakukan oleh protease dari isi perut ikan *skipjack* tuna. Dengan semakin menipisnya pita-pita tersebut, mengindikasikan bahwa jumlah protein yang memiliki ukuran besar semakin berkurang karena protein yang berukuran lebih kecil telah melewati gel akrilamida hingga pada bagian yang lebih jauh. Semakin kecil ukuran protein, maka jarak yang ditempuh oleh protein di dalam gel akrilamida semakin jauh. Pada kolom (b), pita-pita pada sumur-sumur kontrol memiliki pita yang lebih tebal dibandingkan pita pada sumur-sumur sampel. Pada kolom (c), pita-pita pada sumur-sumur kontrol tidak terbentuk, sedangkan pada sumur-sumur sampel banyak terbentuk pita-pita. Dari sumur sampel 5 menit (S1) hingga sumur sampel 180 menit (S5), pita-pita yang terbentuk semakin banyak. Hal ini mengindikasikan bahwa semakin lama waktu inkubasi, maka jumlah protein yang terpotong oleh protease semakin banyak. Pada kolom (d), pita-pita pada sumur sampel 5 menit hingga 180 menit, posisi pita-pita yang terbentuk semakin turun, hal ini menunjukkan bahwa ukuran proteinnya semakin kecil sehingga dapat melewati gel hingga pada bagian bawah.

Dari kedua elektroforegram tersebut, baik hidrolisis asam ataupun basa, dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan antara kontrol dan sampel yang menunjukkan telah terjadi hidrolisis protein dari ikan lemuru. Waktu inkubasi hidrolisis juga menunjukkan bahwa semakin lama waktu hidrolisis yang diberikan, maka semakin banyak protein yang mengalami pemotongan oleh protease dan menghasilkan ukuran protein yang semakin kecil (lebih kecil dari 66 kDa). Hal ini tampak pada

elektroforegram dari sampel dengan waktu inkubasi 30 menit hingga 180 menit secara berturut-turut memiliki pita-pita yang semakin banyak dan semakin bergeser ke bagian bawah gel. Namun, hasil elektroforegram yang telah didapatkan baik hasil elektroforegram dari hidrolisis pada pH 2 maupun pH 8, belum bisa menggambarkan dengan jelas profil peptida yang sesuai dengan nilai %DH yang dilakukan berdasarkan metode formol.



BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

- a. Ekstrak kasar protease berhasil didapatkan dengan mengekstrak isi perut ikan *skipjack* tuna melalui pemblenderan dan sentrifugasi serta pengkondisian pada suhu rendah.
- b. Aktivitas spesifik ekstrak kasar protease optimum pada pH 2 dan pH 8 berturut-turut sebesar 30,5 dan 24,1 unit/mg.
- c. Aktivitas spesifik ekstrak kasar protease pH 2 optimum pada suhu 40⁰C (5,495 unit/mg) dan pH 8 optimum pada suhu 40⁰C (10,430 unit/mg).
- d. Semakin lama waktu inkubasi hidrolisis protein ikan lemuru menggunakan ekstrak kasar protease isi perut ikan *skip jack* tuna, derajat hidrolisis (%DH) pada pH 2 meningkat secara perlahan dan pada pH 8 meningkat secara drastis.
- e. Hasil SDS-PAGE belum bisa menggambarkan profil peptida yang sesuai dengan nilai %DH yang dilakukan berdasarkan metode formol.

5.2 Saran

Diperlukan pemurnian dari ekstrak kasar protease dari ikan *skipjack* tuna pada penelitian selanjutnya untuk mengetahui karakteristiknya. Diperlukan kehati-hatian dalam penyimpanannya ekstrak kasar protease karena harus disimpan dalam suhu -20⁰C dan memiliki waktu penyimpanan yang terbatas dimana semakin lama waktu penyimpanan, aktivitas ekstrak kasar protease akan semakin menurun.



DAFTAR PUSTAKA

- Anonymous. 2007a. *Katsuwonus pelamis* (Linnaeus, 1758), Skipjack tuna: Cakalang. [serial on line] http://research.kahaku.go.jp/zoology/Fishes_of_Bitung/data/p211_01b.html [8 Januari 2007]
- Anonymous. 2007b. *Sardinella lemuru* Bleeker, 1853: Bali sardinella. [serial on line]. http://research.kahaku.go.jp/zoology/Coastal_Fishes_of_Indonesia/data/fish138.html. [8 Januari 2007].
- Anonymous. 2008. *Fish Body Temperature*. [serial on line]. <http://www.lookd.com/fish/bodytemperature.html>. [29 Februari 2008].
- Arbianto, P. 1996. *Biokimia. Konsep-konsep dasar (edisi pertama)*. Bandung: Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan dan Kebudayaan R. I.
- Badan Pusat Statistik. 2003. Produk perikanan. [serial on line]. <http://www.bps.go.id>. [8 Januari 2007].
- Bollag, D. M., Rozycki, M. D. and Edelstein, S. J. 1996. *Protein Methods*. 2nd Edition. New York: Wiley-Liss, Inc.
- Chong, A. S. C., Hashim, R., Chow-Yang, L. and Ali, A. B. 2002. Partial Characterization and Activities of Proteases from the Digestive Tract of Discus Fish. *Aquaculture*, 203:321-333.
- Clemente, A., Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Pedroche, J., Millán, F. 1999. Production of Extensive Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Protein Hydrolysates with Reduced Antigenic Activity. *Journal Agriculture Food Chemistry* 47, pp 3776-3781.
- Co'rdova-Murueta, J. H. and Garcí'a-Carren˜o, F. L. 2002. Nutritive Value of Squid and Hydrolyzed Protein Supplement in Shrimp Feed, *Aquaculture*. 210, pp 371-384.
- Devlin, T. M. (Ed.). 1997. *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlation*. Fourth Edition. New York: Wiley-Liss, Inc.
- Diniz, F. M., and Martin, A. M. 1996. *Use of Response Surface Methodology to Describe and Combined Effects of pH, Temperature and E/S Ratio on the*

- Hydrolysis of Dogfish (Squalus acanthias) Muscle*. International Journal of Food Science and Technology 31: 419-426.
- Doelle, H. W. 1981. Basic Metabolic Processes. In Rehm, H. -J., and Reed, G. (Eds.) *Biotechnology (A Comprehensive Treatise in 8 Volume) Volume 1: Microbial Fundamentals*. Weinheim: Verlag Chemie GmbH. Pp. 113-210.
- Drauz, K. and Waldmann, H. (Eds.). 1995. *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis: A Comprehensive Handbook*. Volume 1. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft, mbh.
- Fersht, A. 1985. *Enzyme Structure and Mechanism, second edition*. New York: W. H. Freeman and Company.
- Freitas, Rui Patricio. 2006. Katsuwonus Pelamis. [serial on line]. <http://www.fishbase.org/Photos/PicturesSummary.cfm?ID=107&what=species>. [8 januari 2007].
- Gardieff, Susie. 2006. Biological profile: Skip jack Tuna. [serial on line]. <http://www.flmnh.ufl.edu/fish/Gallery/Descript/SkipjackTuna/SkipjackTuna.html>. [10 Februari 2007]
- Gildberg, Asbjørn., Arnesen, J. A., Carleho”g, M. 2002. Utilisation of Cod Backbone by Biochemical Fractionation. *Process Biochemistry* 38, pp 475-480.
- Girindra, A. 1990. *Biokimia I*, Edisi Kedua. Jakarta: PT. Gramedia.
- Harrow, B. and Mazur, A. 1962. *Textbook of Biochemistry*. Eight Edition. Philadelphia, London: W. B. Saunders Company.
- Hendritomo, H., Siswa, S. dan Suwendo, H. 2000. *Memberdayakan Nelayan Via Teknologi Enzimatik kecap Ikan*. Halaman 6. Jakarta: Jawa Pos.
- Holme, D. J. and Peck, H. 1998. *Analytical Biochemistry*. Third Edition. New York: Addison Wesley Longman, Ltd.
- Kim, H. R., Meyers, S. P., Godber, J. S. 1992. Purification and Characterization of Anionic Trypsin from the Hepatopancreas of Cryfish (*Procambarus clarkia*). *Comp. Biochem. Physiol*, 103B, pp 391-398.
- Kim, H. R., Meyers, S. P., Godber, J. S. 1994. Enzymatic Properties of Anionic Trypsins from the Hepatopancreas of Cryfish (*Procambarus clarkia*). *Comp. Biochem. Physiol*, 107B, pp 197-203.

- Kim, H. R., Pyeun, J. H. 1986. The Proteinase Distributed in the Intestinal organs of Fish II. Characterization of the Three Alkaline Proteinases from the Pyloric Caeca of Mackerel (*Scomber japonicus*), *Bull. Korean Fish. Soc.*, 19, pp 547-557.
- Klomklao, S., Benjakul, S., Visessanguan, W. 2004. Comparative Studies on Proteolytic Activity of Spleen Extract from Three Tuna Species Commonly Used in Thailand. *J. Food Biochem.*
- Kristinsson, H. G. and Rasco, B. A. 2000a. Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 40(1):43-81. CRC Press LLC.
- Kristinsson, H. G. and Rasco, B. A. 2000b. Kinetics of the Hydrolysis of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Muscle Proteins by Alkaline Protease and Visceral Serine Protease Mixture. *Process Biochemistry*, 36:131-139. Elsevier, Ltd.
- Lehninger, A. L. 1998. *Dasar-dasar Biokimia jilid 1 (Cetakan kelima)*. Terjemahan: Thenawijaya, M. dari *Principles of Biochemistry (1982)*. Jakarta: Erlangga.
- Mahrus. 1997. Pendugaan Stok Ikan Lemuru (*Sardinella lemuru*) dengan Menggunakan Model Schaefer dan Fox. *Oryza-Majalah Ilmiah Universitas Mataram II (8, Januari)*; 109-121.
- Marks, Dawn B., Marks, Allan S., Smith, Colleen M. 1996. Biokimia Kedokteran Dasar : *Sebuah Pendekatan Klinis*. Penerbit Buku Kedokteran : EGC
- Mathews, C. K. and van Holde, K. E. 1990. *Biochemistry*. Redwood City, California: The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.
- Meyer, L. H. 1974. *Food Chemistry*. New York: Modern Asia ed Reinloed Publishing Co.
- Normah, L., Jamilah, I., Saari, N. And Yaakob, B. C. M. 2005. Optimization of Hydrolysis Condition of Threadfin Bream (*Nemipterus japonicus*) Hydrolysates by Alcalase. *Journal of Muscle Foods*, 16:87-102.
- Page, David S. 1997. *Prinsip-prinsip Biokimia Edisi Kedua*. Jakarta: PT. Gelora Aksara Pratama.
- Pigot, G. M. and Tucker, B. W. 1990. *Utility Fish Flesh Effectively While Maintaining Nutritional Qualitie*. *Seafood Effect of Technology on Nutrition*. New York: Marcell Dekker, Inc.

- Ramakrishna, M., Hutlin, H. O., Atallah, M. T. 1987. A Comparison of Dogfish and Bovine Chymotrypsins in Relation to Protein Hydrolysis. *J. Food Sci*, 52, pp 1198-1202.
- Schomburg, D. and Salzmann, M. (Eds.). 1991. *Enzyme Handbook 5: Class 3, Hydrolases*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Simon, Mária L., László, Kinga., Kotormán, Márta and Szajáni, Béla. 2001. *A Comparative Study of the Conformational Stabilities of Trypsin and Chymotrypsin*. [serial on line]. <http://www.sci.u-szeged.hu/ABS>. [29 Februari 2008]
- Solomon, T. W. G. 1990. *Fundamentals of Organic Chemistry*. Fourth Edition. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Stryer, L. 2000. *Biokimia*, Edisi 4, Volume 1. Terjemahan dari "Biochemistry 4th Edition". Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Sudarmadji, S., Haryono, B. dan Suhardi. 1989. *Analisa Bahan Makanan dan Pertanian*. Yogyakarta: Liberty.
- Sudarmadji, S., Haryono, B. dan Suhardi. 1997. *Prosedur Analisa untuk Bahan Makanan dan Pertanian*. Yogyakarta: Liberty.
- Suzuki, T. 1981. *Fish and Krill Protein: Processing Technology*, Applied Science, London, UK.
- Torrissen, K. R. 1984. Characterization of Proteases in the Digestive Tract of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) in Comparison with Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 77, pp 669-674.
- Ushioda, Masa. 2002. Image Quest Marine; Skip Jack Tuna (*Katsuwonus pelamis*). [serial on line]. <http://www.imagequest3d.com/cgi-bin/ImageFolio4/imageFolio.cgi?img=0&search=Katsuwonus&cat=all&bool=p&hase> [8 januari 2007]
- Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Pedroche, J., Yust, M.M., Millán, F. 2000. Péptidos Bioactivos en Proteínas de Reserva. *Grasasy Aceites*, 51, pp 361-365.
- Voet, D. and Voet, J. G. 2004. *Biochemistry*. Third Edition. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.

- Whitaker, J. R. 1994. *Principles of Enzymology for the Food Sciences, second edition*. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Whitehead, Peter J. P. 2007. *Sardinella lemuru* (Bleeker 1853), Taxonomy and Nomenclature. [serial on line]. http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=161700 [8 Januari 2007]
- Winarno, F. G. 1993. *Pangan, Gizi, Teknologi dan Konsumen*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.
- Winarno, F. G. 1995. *Enzim pangan, cetakan ketiga*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.
- Wirahadikusumah, M. 1989. *Biokimia: Protein, Enzim, dan Asam Nukleat*. Bandung: Penerbit ITB.
- Zubay, G. 1993. *Biochemistry*; William C. Brown Publishers, Dubuque, IA.