



**KARAKTERISASI HIDROLISAT PROTEIN IKAN WADER (*Rasbora jacobsoni*) SECARA ENZIMATIS DENGAN ENZIM PROTEASE DARI TANAMAN BIDURI (*Calotropis gigantea*)**

**SKRIPSI**

Oleh

**Tri Norma Sari  
NIM 111710101058**

**JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN  
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN  
UNIVERSITAS JEMBER  
2015**



**KARAKTERISASI HIDROLISAT PROTEIN IKAN WADER (*Rasbora jacobsoni*) SECARA ENZIMATIS DENGAN ENZIM PROTEASE DARI TANAMAN BIDURI (*Calotropis gigantea*)**

**SKRIPSI**

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Strata Satu Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember

Oleh

**Tri Norma Sari**  
**NIM 111710101058**

**JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN**  
**FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN**  
**UNIVERSITAS JEMBER**  
**2015**

## PERSEMBAHAN

Karya tulis ini saya persembahkan kepada :

1. Allah SWT yang telah memberikan rahmat, hidayah, kemudahan dan kekuatan selama ini.
2. Ibu Saripah dan Bapak Gimin tercinta, yang telah sabar mendo'akan dan memberi kasih sayang serta pengorbanan yang besar selama ini.
3. Kakakku Nurgiyanto dan Imam Basori serta seluruh keluarga yang telah memberikan doa, kasih sayang dan dukungan selama ini.
4. Semua guru saya sejak TK sampai Perguruan Tinggi yang terhormat, telah memberikan ilmu, membimbing dengan penuh kesabaran dan keikhlasan.
5. Jajaran Dekanat Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.
6. Mas Riya Adi Prasetya yang telah memberikan semangat, doa, dukungan dan perhatian selama menyelesaikan kuliah, penelitian dan penulisan laporan akhir ini.
7. Almamater tercinta, Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.

**MOTTO**

*Allah tidak membebani seseorang melainkan sesuai dengan kesanggupannya.*

*(QS. Al-Baqarah : 286)*

*Keberhasilan adalah kemampuan untuk melewati dan mengatasi dari satu kegagalan ke kegagalan berikutnya tanpa harus kehilangan semangat.*

*(Winston Churchill)*

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Tri Norma Sari

NIM : 111710101058

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Karakterisasi Hidrolisat Protein Ikan Wader (*Rasbora jacobsoni*) Secara Enzimatis Dengan Enzim Protease Dari Tanaman Biduri (*Calotropis gigantea*)” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab 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, 30 September 2015  
Yang menyatakan,

Tri Norma Sari  
NIM 111710101058

**SKRIPSI**

**KARAKTERISASI HIDROLISAT PROTEIN IKAN WADER (*Rasbora jacobsoni*) SECARA ENZIMATIS DENGAN ENZIM PROTEASE DARI TANAMAN BIDURI (*Calotropis gigantea*)**

oleh

**Tri Norma Sari**

**NIM. 111710101058**

Pembimbing:

Dosen Pembimbing Utama : Dr. Yuli Witono, S.TP., M.P

Dosen Pembimbing Anggota : Dr. Yuli Wibowo, S.TP., M.Si

**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul “Karakterisasi Hidrolisat Protein Ikan Wader (*Rasbora jacobsoni*) Secara Enzimatis Dengan Enzim Protease Dari Tanaman Biduri (*Calotropis gigantea*)” karya Tri Norma Sari/ 111710101058 telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Teknologi Hasil Pertanian Universitas Jember pada :

Hari/ Tanggal : Selasa, 27 Oktober 2015

Tempat : Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember

Ketua Penguji

Anggota Penguji

Dr. Ir. Herlina., M.P  
196605181993022001

Dr. Bambang Herry P, S.TP., M.P  
197505301999031002

Mengesahkan,  
Dekan Fakultas Teknologi Pertanian

Dr. Yuli Witono, S.TP., M.P  
19691212199821001



## RINGKASAN

**Karakteristik Hidrolisat Protein Ikan Wader (*Rasbora jacobsoni*) Secara Enzimatis Dengan Enzim Protease Dari Tanaman Biduri (*Calotropis gigantea*);** Tri Norma Sari, 111710101058; 2015; 88 Halaman; Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.

Penggunaan MSG sebagai penyedap rasa oleh sebagian masyarakat telah melebihi dosis aman konsumsi yang berpotensi dapat mengganggu kesehatan. Salah satunya dapat memunculkan gejala seperti kesemutan, leher terasa panas, sesak dada dan pusing kepala yang disebut dengan istilah CRS (*Chinese Restaurant Syndrome*). Oleh karena itu, perlu adanya pengembangan mengenai pembuatan flavor enhancer alami yang aman dan bersifat multi fungsi bagi tubuh. Ikan wader merupakan jenis ikan air tawar yang keberadaannya cukup melimpah dan memiliki kandungan protein yang cukup tinggi yaitu 14,8% namun pemanfaatannya belum maksimal. Kandungan protein yang cukup tinggi pada ikan wader dapat dimanfaatkan untuk pembuatan hidrolisat protein ikan. Tujuan dari penelitian ini adalah: 1) Mengetahui pengaruh konsentrasi enzim protease biduri dan variasi waktu hidrolisis terhadap sifat-sifat hidrolisat protein ikan wader, 2) Mengetahui kombinasi yang tepat antara konsentrasi enzim protease biduri dan lama hidrolisis sehingga dihasilkan hidrolisat protein dengan karakteristik yang baik.

Peneitian ini dilakukan dengan membuat hidrolisat protein ikan dengan penambahan enzim protease biduri sebesar 1%, 2% dan 3% dari berat daging ikan hidrolisis dilakukan selama 0 jam; 1,5 jam dan 3 jam. Hidrolisat kering yang dihasilkan dilakukan analisis proksimat (kadar air, abu, lemak dan protein), kadar protein terlarut, *maillard*, tingkat ketengikan, total padatan terlarut, warna, daya buih dan stabilitas buih, serta daya dan stabilitas emulsi. Penelitian ini menggunakan metode rancangan acak lengkap faktorial, setiap perlakuan diulang sebanyak tiga kali ulangan. Data diolah dengan anava dan apabila terdapat perbedaan dilakukan uji lanjut BNT pada taraf 5%.



Hasil penelitian menunjukkan bahwa Penambahan enzim protease biduri pada berbagai konsentrasi dan lama hidrolisis berpengaruh nyata terhadap kadar abu, kadar lemak, kadar protein terlarut, nilai produk maillard, tingkat ketengikan, total padatan terlarut, daya emulsi, stabilitas emulsi dan stabilitas buih, serta tidak berpengaruh nyata terhadap kadar air, warna serta daya buihnya. Hidrolisat protein ikan wader yang terbaik dihasilkan dari perlakuan B3T3 yaitu penambahan enzim protease biduri 3% dan lama hidrolisis 3 jam. Hidrolisat protein ikan wader yang dihasilkan mempunyai kadar air sebesar 8,15%, kadar abu 4,58% (db), kadar lemak 14,26% (db), kadar protein 65,84% (db), protein terlarut 65,90 mg/ml, produk maillard 1,64 , tingkat ketengikan 0,09 mmol/kg, warna ( $^{\circ}$ Hue) 74,01 , total padatan terlarut ( $^{\circ}$ Brix) 12, daya emulsi 3,67  $m^2/g$ , stabilitas emulsi 163,49 jam, daya buih 258,02 dan stabilitas buih 24,02%.

## SUMMARY

**Characterization of Wader Fish (*Rasbora jacobsoni*) Protein Hydrolyzate Made By Enzymatic Hydrolysis Using Protease From Biduri (*Calotropis gigantea*)** ; Tri Norma Sari, 111710101058; 2015; 88 Page; Departement of Agricultural Product Technology, Faculty of Agricultural Technology, University of Jember.

The use of MSG as a flavor enhancer by most public consumption has exceeded safe dose that could potentially harm our health. One of them can bring symptoms such as tingling, hot neck, chest tightness and headaches were called CRS (Chinese Restaurant Syndrome). Therefore, the need for the development of the making of safe natural flavor enhancer and has the benefit for human's health. Wader fish are freshwater fish species whose existence is abundant and has a high protein content, it's about 14.8%, but its use is not maximized. The protein content is quite high in fish wader can be utilized for the making of fish protein hydrolyzate. The purpose of this research are: 1) Determine the influence of the concentration of the enzyme protease Biduri and variations of hydrolysis time on the properties of protein hydrolysates wader fish, 2) Know the right combination between the concentration of the enzyme protease Biduri and long hydrolysis which the best biochemical contents and functional properties.

This research was conducted by making the fish protein hydrolyzate with addition of protease enzymes of Biduri with 1%, 2% and 3% of the weight of fish meat hydrolysis carried out for 0 hours; 1.5 hours and 3 hours. Dry hydrolyzate was determined by proximate analysis (moisture, ash, fat and protein), the levels of soluble protein, Maillard, the level of rancidity, total dissolved solids, color, foaming power and foam stability, and power and stability of the emulsion. This study uses a completely randomized factorial design, each treatment was repeated three times repetition. Data processed by ANOVA and if there are further differences in BNT test at 5% level.

The results showed that the addition of the protease enzyme of Biduri at various concentrations and long hydrolysis significant effect on ash content, fat content, protein content of dissolved, the value of Maillard products, the level of rancidity, total dissolved solids, power emulsion, the emulsion stability and the stability of the froth, and has no effect significant effect on moisture content, color and foam power. Wader fish protein hydrolyzate best results from treatment B3T3 the addition of a protease enzyme Biduri 3% and 3 hours long hydrolysis. Wader fish protein hydrolyzate produced has a water content 8.15%, ash content 4.58% (db), the fat content 14.26% (db), the protein content 65.84% (db), soluble protein 65.90 mg / ml, 1.64 Maillard products, rancidity levels 0.09 mmol / kg, color (oHue) 74.01, total dissolved solids (oBrix) 12, power emulsion of 3.67 m<sup>2</sup> / g, the stability of the emulsion 163.49 hours , power stability of the froth 258,02, and froth stability 24.02%.

## PRAKATA

Alhamdulillahirobbil'alamin, puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Karakterisasi Hidrolisat Protein Ikan Wader (*Rasbora jacobsoni*) Secara Enzimatis Dengan Enzim Protease Dari Tanaman Biduri (*Calotropis gigantea*)”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan Strata Satu (S1) pada Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember. Dalam penyusunan skripsi ini penulis tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, sehingga penulis mengucapkan terima kasih kepada :

1. Dr. Yuli Witono, S.TP., M.P., selaku Dekan Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember dan Dosen Pembimbing Utama, yang telah meluangkan waktu dan pikiran dengan sabar dan tulus guna memberikan bimbingan dan pengarahan demi kemajuan, penyelesaian penelitian dan penulisan skripsi ini;
2. Dr. Yuli Wibowo, S.TP.,M.Si., selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu dan pikiran guna memberikan bimbingan dan pengarahan demi kemajuan, penyelesaian penelitian dan penulisan skripsi;
3. Dr. Ir. Herlina, M.P dan Dr. Bambang Herry Purnomo, S.TP., M.Si., selaku tim penguji atas saran dan evaluasi demi perbaikan penulisan skripsi;
4. Dr. Bambang Herry Purnomo, S.TP., M.Si., selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah memberikan saran dan nasehatnya;
5. Ibu Saripah dan Bapak Gimin serta seluruh keluarga besar yang telah memberikan do'a dan dorongan demi terselesaikannya skripsi ini;
6. Lailatul Adzkiya, S.TP., M.P yang telah meluangkan waktu untuk membimbing dan memberikan motivasi dalam penyelesaian skripsi ini;
7. Seluruh karyawan dan teknisi Laboratorium Kimia dan Biokimia Hasil Pertanian dan Laboratorium Rekayasa Proses Hasil Pertanian di Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember;
8. Teman-teman Brotherhood (THP, FTP 2011) yang telah memberikan dukungan dan semangat;

9. Rekan tim penelitian, Isnairil, Maria dan Wildan yang telah turut merasakan jerih payah selama proses penelitian;
10. Teman-teman kost Jl. Kalimantan 49B (Anggi, Riska, Puji, Cahya, Aini, Lika, Tata, Khusnul dan Iif) yang telah memberikan semangat selama proses penyelesaian skripsi ini;
11. Semua pihak yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi ini baik secara langsung maupun tidak langsung.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, September 2015

Penulis

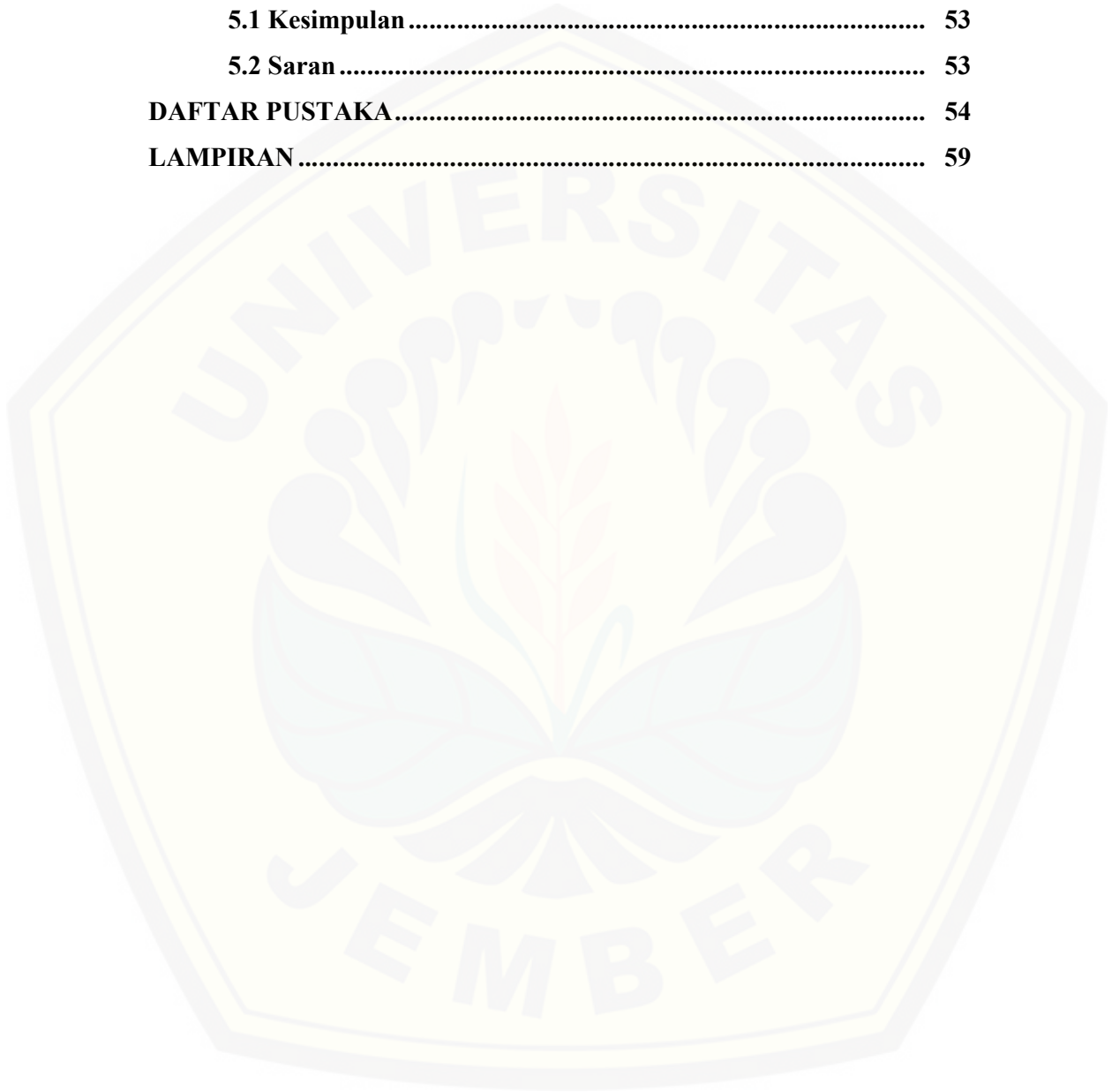
DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL .....	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN .....	iii
HALAMAN MOTTO .....	iv
HALAMAN PERNYATAAN .....	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN .....	vi
HALAMAN PENGESAHAN .....	vii
RINGKASAN.....	viii
SUMMARY.....	x
PRAKATA .....	xi
DAFTAR ISI.....	xiii
DAFTAR TABEL .....	xvi
DAFTAR GAMBAR.....	xvii
DAFTAR LAMPIRAN .....	xix
<b>BAB 1. PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Latar Belakang .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Perumusan Masalah .....</b>	<b>2</b>
<b>1.3 Tujuan Penelitian .....</b>	<b>3</b>
<b>1.4 Manfaat Penelitian.....</b>	<b>3</b>
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1 Ikan Wader (<i>Rasbora jacobsoni</i>).....</b>	<b>4</b>
<b>2.2 Perubahan Daging Ikan Segar .....</b>	<b>5</b>
<b>2.3 Hidrolisis Protein.....</b>	<b>7</b>
<b>2.4 Hidrolisat Protein .....</b>	<b>8</b>
<b>2.5 Enzim Protease .....</b>	<b>9</b>
<b>2.6 Parameter Pengamatan .....</b>	<b>12</b>
2.6.1 Kadar Protein Terlarut.....	12
2.6.2 Jumlah Produk Maillard.....	13
2.6.3 Daya dan Stabilitas Emulsi.....	13



2.6.4 Daya dan Stabilitas Buih .....	14
2.6.5 Tingkat Ketengikan.....	15
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN .....</b>	<b>17</b>
<b>3.1 Bahan dan Alat Penelitian.....</b>	<b>17</b>
3.1.1 Bahan Penelitian .....	17
3.1.2 Alat Penelitian .....	17
<b>3.2 Tempat dan Waktu Penelitian .....</b>	<b>17</b>
<b>3.3 Metode Penelitian .....</b>	<b>18</b>
3.3.1 Pelaksanaan Penelitian .....	18
3.3.2 Rancangan Penelitian.....	19
<b>3.4 Parameter Analisis .....</b>	<b>22</b>
<b>3.5 Prosedur Analisa .....</b>	<b>22</b>
3.5.1 Analisis Proksimat .....	22
3.5.2 Kadar Protein Terlarut.....	25
3.5.3 Jumlah Produk Maillard .....	25
3.5.4 Tingkat Ketengikan.....	25
3.5.5 Total Padatan Terlarut.....	25
3.5.6 Warna .....	26
3.5.7 Daya Emulsi dan Stabilitas Emulsi.....	26
3.5.8 Daya Buih dan Stabilitas Buih.....	27
<b>3.6 Analisis Data .....</b>	<b>28</b>
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>29</b>
<b>4.1 Kadar Air.....</b>	<b>29</b>
<b>4.2 Kadar Abu .....</b>	<b>30</b>
<b>4.3 Kadar Lemak.....</b>	<b>32</b>
<b>4.4 Kadar Protein .....</b>	<b>34</b>
<b>4.5 Kadar Protein Terlarut .....</b>	<b>35</b>
<b>4.6 Produk Maillard .....</b>	<b>37</b>
<b>4.7 Tingkat Ketengikan .....</b>	<b>39</b>
<b>4.8 Total Padatan Terlarut.....</b>	<b>41</b>
<b>4.9 Warna.....</b>	<b>43</b>

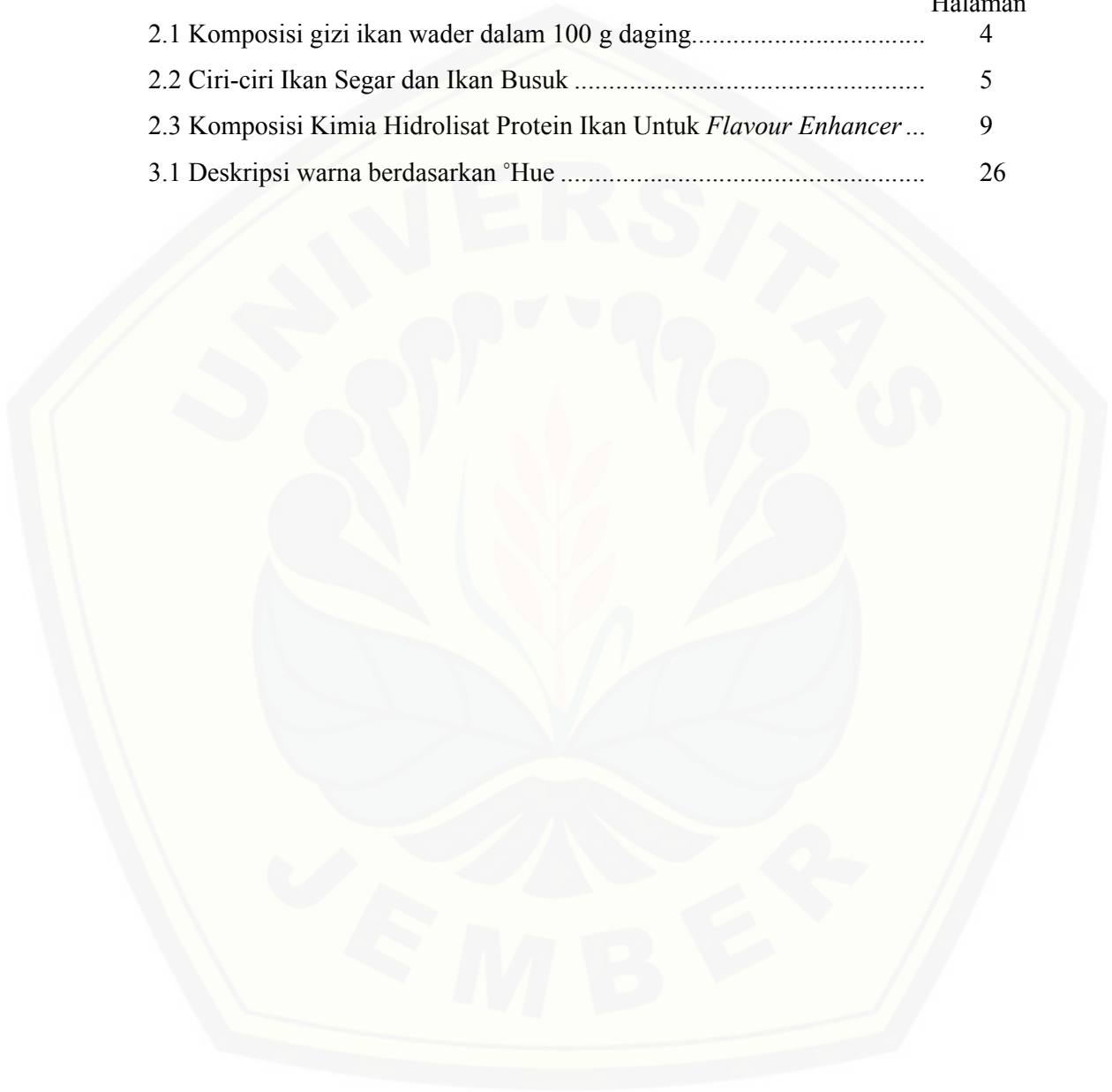
4.10 Daya Emulsi Dan Stabilitas Emulsi .....	45
4.11 Daya Buih Dan Stabilitas Buih.....	49
<b>BAB 5. PENUTUP .....</b>	<b>53</b>
<b>5.1 Kesimpulan .....</b>	<b>53</b>
<b>5.2 Saran .....</b>	<b>53</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>54</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>59</b>





**DAFTAR TABEL**

	Halaman
2.1 Komposisi gizi ikan wader dalam 100 g daging.....	4
2.2 Ciri-ciri Ikan Segar dan Ikan Busuk .....	5
2.3 Komposisi Kimia Hidrolisat Protein Ikan Untuk <i>Flavour Enhancer</i> ...	9
3.1 Deskripsi warna berdasarkan °Hue .....	26



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Ikan Wader ( <i>Rasbora jacobsoni</i> ) .....	4
2.2 Hidrolisis Ikatan Peptida Oleh Enzim Protease .....	8
2.3 Tanaman Biduri ( <i>Calotropis gigantea</i> ) .....	11
3.1 Diagram Alir Pembuatan Hidrolisat Kering Ikan Wader .....	21
4.1 Kadar Air Hidrolisat Protein Ikan Wader Berdasarkan Faktor B (Konsentrasi Enzim) (a) dan Faktor T (Lama Hidrolisis) (b).....	29
4.2 Kadar Air Hidrolisat Protein Ikan Wader oleh Protease Biduri pada Berbagai Konsentrasi Enzim dan Lama Hidrolisis.....	30
4.3 Kadar Abu Hidrolisat Protein Ikan Wader Berdasarkan Faktor B (Konsentrasi Enzim) (a) dan Faktor T (Lama Hidrolisis) (b).....	31
4.4 Kadar Abu Hidrolisat Protein Ikan Wader oleh Protease biduri pada Berbagai Konsentrasi Enzim dan Lama Hidrolisis.....	32
4.5 Kadar Lemak Hidrolisat Protein Ikan Wader Berdasarkan Faktor B (Konsentrasi Enzim) (a) dan Faktor T (Lama Hidrolisis) (b).....	33
4.6 Kadar Lemak Hidrolisat Protein Ikan Wader oleh Protease Biduri pada Berbagai Konsentrasi Enzim dan Lama Hidrolisis.....	34
4.7 Kadar Protein Hidrolisat Protein Ikan Wader oleh Protease Biduri pada Berbagai Konsentrasi Enzim dan Lama Hidrolisis.....	35
4.8 Kadar Protein Terlarut Hidrolisat Protein Ikan Wader Berdasarkan Faktor B (Konsentrasi Enzim) (a) dan Faktor T (Lama Hidrolisis) (b).....	36
4.9 Kadar Protein Terlarut Hidrolisat Protein Ikan Wader oleh Protease biduri pada Berbagai Konsentrasi Enzim dan Lama Hidrolisis .....	37
4.10 Nilai Produk Maillard Hidrolisat Protein Ikan Wader Berdasarkan Faktor B (Konsentrasi Enzim) (a) dan Faktor T (Lama Hidrolisis) (b) .....	38
4.11 Nilai Produk Maillard Hidrolisat Protein Ikan Wader oleh Protease biduri pada Berbagai Konsentrasi Enzim dan Lama Hidrolisis .....	39

4.12	Tingkat Ketengikan Hidrolisat Protein Ikan Wader Berdasarkan Faktor B (Konsentrasi Enzim) (a) dan Faktor T (Lama Hidrolisis) (b) .....	40
4.13	Tingkat Ketengikan Hidrolisat Protein Ikan Wader oleh Protease Biduri pada Berbagai Konsentrasi Enzim dan Lama Hidrolisis .....	41
4.14	Total Padatan Terlarut Hidrolisat Protein Ikan Wader Berdasarkan Faktor B (Konsentrasi Enzim) (a) dan Faktor T (Lama Hidrolisis) (b) .....	42
4.15	Total padatan terlarut Hidrolisat Protein Ikan Wader oleh Protease biduri pada Berbagai Konsentrasi Enzim dan Lama Hidrolisis.....	43
4.16	Warna Hidrolisat Protein Ikan Wader Berdasarkan Faktor B (Konsentrasi Enzim) (a) dan Faktor T (Lama Hidrolisis) (b).....	44
4.17	Warna Hidrolisat Protein Ikan Wader oleh Protease biduri pada Berbagai Konsentrasi Enzim dan Lama Hidrolisis.....	45
4.18	Daya Emulsi Hidrolisat Protein Ikan Wader Berdasarkan Faktor B (Konsentrasi Enzim) (a) dan Faktor T (Lama Hidrolisis) (b).....	46
4.19	Daya emulsi Hidrolisat Protein Ikan Wader oleh Protease biduri pada Berbagai Konsentrasi Enzim dan Lama Hidrolisis.....	47
4.20	Stabilitas Emulsi Hidrolisat Protein Ikan Wader Berdasarkan Faktor B (Konsentrasi Enzim) (a) dan Faktor T (Lama Hidrolisis) (b) .....	48
4.21	Stabilitas emulsi Hidrolisat Protein Ikan Wader oleh Protease biduri pada Berbagai Konsentrasi Enzim dan Lama Hidrolisis.....	49
4.22	Daya Buih Hidrolisat Protein Ikan Wader oleh Protease Biduri pada Berbagai Konsentrasi Enzim dan Lama Hidrolisis.....	50
4.23	Stabilitas Buih Hidrolisat Protein Ikan Wader Berdasarkan Faktor B (Konsentrasi Enzim) (a) dan Faktor T (Lama Hidrolisis) (b) .....	51
4.24	Stabilitas Buih Hidrolisat Protein Ikan Wader oleh Protease biduri pada Berbagai Konsentrasi Enzim dan Lama Hidrolisis.....	52

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
<b>A. Data dan Perhitungan Analisis Kadar Air Hidrolisat Protein Ikan Wader .....</b>	<b>59</b>
A.1 Data Analisis Kadar air Hidrolisat Protein Ikan Wader .....	59
A.2 Perhitungan Analisa Kadar Air Hidrolisat Protein Ikan Wader.....	60
A.3 Sidik Ragam Analisa Kadar Air Hidrolisat Protein Ikan Wader .....	60
A.4 Uji beda Kadar Air Hidrolisat Protein Ikan Wade .....	60
<b>B. Data dan Perhitungan Analisis Kadar Air Hidrolisat Protein Ikan Wader .....</b>	<b>61</b>
B.1 Data Analisis Kadar abu Hidrolisat Protein Ikan Wader.....	61
B.2 Perhitungan Analisa Kadar Abu (wb) Hidrolisat Protein Ikan Wader .....	62
B.3 Perhitungan Analisa Kadar Abu (db) Hidrolisat Protein Ikan Wader .....	62
B.4 Sidik Ragam Analisa Kadar Abu (db) Hidrolisat Protein Ikan Wader .....	62
B.5 Uji beda Kadar Abu Hidrolisat Protein Ikan Wader .....	63
<b>C. Data dan Perhitungan Analisis Kadar Lemak Hidrolisat Protein Ikan Wader .....</b>	<b>64</b>
C.1 Data Analisis Kadar Lemak Hidrolisat Protein Ikan Wader.....	64
C.2 Perhitungan Analisa Kadar Lemak (wb) Hidrolisat Protein Ikan Wader .....	65
C.3 Perhitungan Analisa Kadar Lemak (db) Hidrolisat Protein Ikan Wader .....	65
C.4 Sidik Ragam Analisa Kadar Lemak (db) Hidrolisat Protein Ikan Wader .....	65
C.5 Uji beda Kadar Lemak Hidrolisat Protein Ikan Wader.....	66
<b>D. Data dan Perhitungan Analisis Kadar Protein Hidrolisat Protein Ikan Wader .....</b>	<b>67</b>
D.1 Data dan Perhitungan Analisa Kadar Protein (wb) Hidrolisat Protein Ikan Wader .....	67
D.2 Data dan Perhitungan Analisa Kadar Protein (db) Hidrolisat	

Protein Ikan Wader .....	67
D.3 Sidik Ragam Analisa Kadar Protein Hidrolisat Protein Ikan Wader .....	67
<b>E. Data dan Perhitungan Analisis Kadar Protein Terlarut Hidrolisat Protein Ikan Wader .....</b>	<b>68</b>
E.1 Kurva Standar BSA ( <i>Bovine Serum Albumin</i> ) .....	68
E.2 Data Analisis Kadar Protein Terlarut Hidrolisat Protein Ikan Wader .....	69
E.3 Perhitungan Analisa Kadar Protein Terlarut Hidrolisat Protein Ikan Wader .....	69
E.4 Sidik Ragam Analisa Kadar Protein Terlarut Hidrolisat Protein Ikan Wader .....	69
E.5 Uji beda Kadar Protein Terlarut Hidrolisat Protein Ikan Wader.....	70
<b>F. Data dan Perhitungan Analisis Nilai Produk Maillard Hidrolisat Protein Ikan Wader .....</b>	<b>72</b>
F.1 Data dan Perhitungan Analisis Nilai Produk Maillard Hidrolisat Protein Ikan Wader .....	72
F.2 Sidik Ragam Analisa Nilai Produk Maillard Hidrolisat Protein Ikan Wader .....	72
F.3 Uji beda Nilai Produk Maillard Hidrolisat Protein Ikan Wader.....	72
<b>G. Data dan Perhitungan Analisis Tingkat Ketengikan Hidrolisat Protein Ikan Wader .....</b>	<b>74</b>
G.1 Data Analisis Tingkat Ketengikan Hidrolisat Protein Ikan Wader .	74
G.2 Perhitungan Analisa Tingkat Ketengikan Hidrolisat Protein Ikan Wader .....	74
G.3 Sidik Ragam Analisa Tingkat Ketengikan Hidrolisat Protein Ikan Wader .....	74
G.4 Uji beda Tingkat Ketengikan Hidrolisat Protein Ikan Wader .....	75
<b>H. Data dan Perhitungan Analisis Total Padatan Terlarut Hidrolisat Protein Ikan Wader .....</b>	<b>76</b>
H.1 Data dan Perhitungan Analisis Total Padatan Terlarut Hidrolisat Protein Ikan Wader .....	76
H.2 Sidik Ragam Analisa Total Padatan Terlarut Hidrolisat Protein Ikan Wader .....	76
H.3 Uji beda Total Padatan Terlarut Hidrolisat Protein Ikan Wader .....	76



<b>I. Data dan Perhitungan Analisis Warna Hidrolisat Protein Ikan Wader .....</b>	<b>78</b>
I.1 Data Analisis Warna Hidrolisat Protein Ikan Wader .....	78
I.2 Perhitungan Analisa Warna Hidrolisat Protein Ikan Wader .....	78
I.3 Sidik Ragam Analisa Warna Hidrolisat Protein Ikan Wader .....	79
I.4 Uji Beda Analisis Warna Hidrolisat Protein Ikan Wader .....	79
<b>J. Data dan Perhitungan Analisis Daya dan Stabilitas Emulsi Hidrolisat Protein Ikan Wader.....</b>	<b>80</b>
10.1 Perhitungan Analisis Daya Emulsi Hidrolisat Protein Ikan Wader .....	80
10.2 Perhitungan Analisis Stabilitas Emulsi Hidrolisat Protein Ikan Wader .....	80
10.3 Sidik Ragam Analisis Daya Emulsi Hidrolisat Protein Ikan Wader .....	80
10.4 Sidik Ragam Analisis Stabilitas Emulsi Hidrolisat Protein Ikan Wader .....	81
10.5 Uji Beda Daya Emulsi Hidrolisat Protein Ikan Wader .....	81
10.6 Uji Beda Stabilitas Emulsi Hidrolisat Protein Ikan Wader .....	82
<b>K. Data dan Perhitungan Analisis Daya dan Stabilitas Buih Hidrolisat Protein Ikan Wader .....</b>	<b>84</b>
K.1 Data Analisis Daya dan Stabilitas Buih Hidrolisat Protein Ikan Wader .....	84
K.2 Perhitungan Analisis Daya Buih Hidrolisat Protein Ikan Wader.....	84
K.3 Perhitungan Analisis Stabilitas Buih Hidrolisat Protein Ikan Wader .....	85
K.4 Sidik Ragam Analisis Daya Buih Hidrolisat Protein Ikan Wader ...	85
K.5 Sidik Ragam Analisis Stabilitas Buih Hidrolisat Protein Ikan Wader .....	85
K.6 Uji Beda Stabilitas Emulsi Hidrolisat Protein Ikan Wader .....	86
<b>L. Penentuan Kombinasi Terbaik Hidrolisat Protein Ikan Wader .....</b>	<b>88</b>

## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Dewasa ini perkembangan industri pangan semakin cepat dan dituntut untuk lebih inovatif dalam mengembangkan produknya. Dalam memproduksi suatu produk pangan kebanyakan produsen menggunakan bahan tambahan sebagai pembangkit rasa (*flavor enhancer*). Dua jenis bahan pembangkit rasa yang umum digunakan adalah asam amino L atau garamnya, seperti Monosodium Glutamat (MSG) dan jenis 5'-nukleotida seperti Inosin 5'-monofosfat (5'-IMP) (Winarno, 2002).

Penggunaan MSG sebagai penyedap rasa oleh sebagian masyarakat telah melebihi dosis aman konsumsi yang berpotensi dapat mengganggu kesehatan. Hal ini dikarenakan MSG akan terurai menjadi sodium dan glutamate dalam tubuh, sehingga MSG merupakan sumber natrium yang tinggi (Witono, 2004). Konsumsi MSG yang berlebihan akan menyebabkan rasa pusing dan mual. Gejala tersebut disebut dengan istilah CRS (*Chinese Restaurant Syndrome*). Gejala CRS meliputi kesemutan pada punggung leher, leher terasa panas, wajah berkeringat, sesak dada dan pusing kepala. Gejala tersebut timbul karena adanya senyawa hasil metabolisme glutamat seperti GABA (*gama amino butyric acid*), serotin atau histamin (Winarno, 2002). Oleh karena itu, perlu adanya pengembangan mengenai pembuatan *flavor enhancer* alami yang aman dan bersifat multi fungsi bagi tubuh.

Penelitian Witono, dkk. (2014) menyebutkan bahwa hidrolisat protein ikan air laut memiliki potensi yang besar untuk dikembangkan sebagai *flavor enhancer* alami. Hal ini juga didukung oleh ketersediaan ikan, baik ikan air laut maupun ikan air tawar di Indonesia yang cukup melimpah. Menurut Badan Pusat Statistik (2015), produksi perairan umum di Indonesia pada tahun 2010 sebanyak 295.736 ton dan pada tahun 2013 meningkat menjadi 398.213 ton atau setara dengan 35%.

Hidrolisat protein merupakan produk yang dihasilkan dari pemecahan protein menjadi peptida sederhana dan asam amino melalui proses hidrolisis



dengan menggunakan enzim, asam atau basa dan panas. Proses hidrolisis yang sering digunakan adalah secara enzimatis. Hidrolisis protein dengan menggunakan enzim lebih aman dan menguntungkan daripada menggunakan asam atau basa pada pembuatan flavor enhancer. Menurut Kristinson (2007) hidrolisis secara enzimatis akan menghasilkan hidrolisat protein yang terhindar dari kerusakan asam-asam amino, seperti triptofan dan glutamin.

Salah satu enzim protease yang dapat digunakan pada proses hidrolisis adalah enzim protease dari tanaman biduri (*Calotropis gigantea*) yang bersumber dari alam lokal Indonesia. Protease biduri dapat dihasilkan dari ekstrak tanaman biduri baik getah, batang maupun daun (Witono, 2002a; dan Witono, 2002b). Enzim protease dari tanaman biduri termasuk golongan eksopeptidase yang sangat baik diaplikasikan pada pembuatan hidrolisat protein (Witono, 2004).

Hasil penelitian Mananda (2014) dapat diketahui bahwa hidrolisat ikan inferior (ikan lidah, ikan bibisan dan ikan baji-baji) hasil dari hidrolisis menggunakan kombinasi enzim biduri dan *Carica papaya* (papain) dapat digunakan sebagai *flavor enhancer*. Ikan wader merupakan jenis ikan sungai yang keberadaannya melimpah namun pemanfaatannya belum maksimal. Pada umumnya pemanfaatan ikan wader hanya dikonsumsi sebagai lauk makan. Kandungan protein pada ikan wader cukup tinggi yaitu sebesar 14,8% (Zaelani, 2012) yang berpotensi digunakan sebagai bahan baku *flavor enhancer* alami. Hidrolisat protein ikan memiliki kandungan protein tinggi, asam amino lengkap, daya cerna protein tinggi dan sifat fungsional yang baik dalam pengolahan bahan pangan. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian mengenai pembuatan hidrolisat protein ikan wader dengan menggunakan enzim protease dari tanaman biduri sebagai salah satu alternatif bahan pembangkit rasa alami pengganti MSG.

## 1.2 Rumusan Masalah

Pembuatan hidrolisat protein ikan wader secara enzimatis dengan menggunakan enzim protease biduri antara lain dipengaruhi oleh penambahan enzim dan waktu hidrolisis yang digunakan. Permasalahan yang muncul adalah belum diketahuinya konsentrasi enzim protease biduri dan waktu yang tepat pada

pembuatan hidrolisat protein ikan wader sehingga dihasilkan hidrolisat dengan karakteristik baik sebagai bahan baku pada pembuatan *flavor enhancer*.

### 1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Mengetahui pengaruh konsentrasi enzim protease biduri dan variasi waktu hidrolisis terhadap sifat-sifat hidrolisat protein ikan wader.
2. Mengetahui kombinasi yang tepat antara konsentrasi enzim protease biduri dan lama hidrolisis yang memiliki kandungan biokimia dan sifat fungsional yang terbaik.

### 1.4 Manfaat

Manfaat yang diharapkan dari penelitian ini adalah :

1. Menambah alternatif flavor alami sebagai bahan tambahan pangan yang lebih aman untuk industri pangan.
2. Mendorong penggalian sumber-sumber flavor alami baru berbasis potensi ikan sungai dan air tawar di Indonesia.
3. Meningkatkan nilai guna ikan wader yang belum termanfaatkan secara optimal untuk produk olahan pangan.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Ikan Wader

Ikan wader (*Rasbora jacobsoni*) merupakan ikan berukuran kecil yang sering ditemukan di sungai, sawah maupun selokan yang berair jernih dan biasanya hidup dalam koloni. Ukuran ikan wader rata-rata sekitar 7 – 20 cm (Wooton, 1992). Warna tubuh ikan wader adalah coklat kekuning-kuningan dengan perak kemilau dan berwarna agak gelap di bagian dorsal. Sisik tepi ikan wader bergaris coklat. Bentuk ikan wader dapat dilihat pada **Gambar 2.1**.



**Gambar 2.1** Ikan wader (*Rasbora jacobsoni*)

Menurut Budiharjo (2002), ikan wader merupakan kelompok yang terdiri adad beberapa jenis ikan, bahkan dapat berasal dari genus yang berbeda antara lain dari genus *Rasbora* dan *Puntius*. Setiap jenis memiliki sifat yang berbeda, baik ukuran tubuh, kecepatan pertumbuhan dan rasa dagingnya. Sebaran ikan wader ini sangat luas, antara lain Sumatra, Jawa, Kalimantan, Bali, Nusa Tenggara dan Sulawesi. Klasifikasi ikan wader (*Rasbora jacobsoni*) adalah :

Kingdom : Animalia  
Phylum : Chordata  
Sub Phylum : Vertebrata  
Class : Pisces  
Sub Class : Teleostei  
Ordo : Cypriniformes  
Familia : Cyprinidae

Genus : *Rasbora*

Species : *Rasbora jacobsoni*

Ikan wader pada umumnya dimanfaatkan untuk dikonsumsi sebagai lauk makan karena memiliki rasa yang gurih dan renyah. Komposisi gizi ikan wader dapat dilihat pada **Tabel 2.1**.

**Tabel 2.1** Komposisi gizi ikan wader dalam 100 g daging

Kandungan gizi	Nilai
Air (%)	76
Protein (g)	14,8
Lemak (g)	2,3
Kolesterol (mg)	58
Zat besi (mg)	0,3

Sumber : Zaelani (2012)

## 2.2 Perubahan Daging Ikan Segar

Ikan segar adalah ikan yang kondisinya dipertahankan segar dengan cara pendinginan yang tidak beku sehingga kualitas ikan masih bisa dipertahankan sama atau mendekati keadaan ikan seperti baru ditangkap. Ciri-ciri ikan segar dan ikan yang mulai membusuk dapat dilihat pada **Tabel 2.2**.

**Tabel 2.2** Ciri-ciri Ikan Segar dan Ikan Busuk

Parameter	Ikan Segar	Ikan Busuk
Kulit	- warna kulit terang dan jernih - kulit masih kuat membungkus tubuh, tidak mudah sobek, terutama bagian perut - warna-warna khusus yang ada masih terlihat jelas	- kulit berwarna suram, pucat dan berlendir banyak - kulit mulai terlihat mengendur di beberapa tempat tertentu - kulit mudah sobek dan warna khusus sudah hilang
Sisik	- sisik menempel kuat pada tubuh sehingga sulit dilepas	- sisik mudah terlepas dari tubuh
Mata	- mata tampak terang, menonjol dan cembung	- mata tampak suram, tenggelam dan berkerut
Insang	- insang berwarna merah sampai merah tua, terang dan lamella insang terpisah - insang tertutup oleh lender berwarna terang dan berbau segar seperti bau ikan	- insang berwarna coklat suram atau abu-abu dan lamella insang berdempetan - lender insang keruh dan berbau asam, menusuk hidung
Daging	- daging kenyal, menandakan	- daging lunak, menandakan

	rigor mortis masih berlangsung - daging dan bagian tubuh lain berbau segar - bila daging ditekan dengan jari tidak tampak bekas lekukan - daging melekat kuat pada tulang - daging perut utuh dan kenyal - warna daging putih	rigor mortis telah selesai - daging dan bagian tubuh lain mulai berbau busuk - bila ditekan dengan jari tampak bekas lekukan - daging mudah lepas dari tulang - daging lembek dan isi perut sering keuar - daging berwarna kuning kemerahan disekitar tulang punggung - ikan yang sudah sangat membusuk akan mengapung di permukaan air
Disimpan dalam air	- ikan segar akan tenggelam	

Sumber : Afrianto dan Liviawaty (1989)

Setelah ikan mati terjadi perubahan fisiko kimia pada ikan tersebut. Peredaran darah pada ikan akan berhenti dan hasilnya adalah berlangsungnya serangkaian perubahan yang kompleks dalam otot. Semakin banyak darah yang hilang dari tubuh ikan akan meningkatkan umur simpan serta kualitas daging ikan yang dihasilkan. Perubahan dalam otot setelah ikan mati dapat dibagi menjadi tiga tahap yaitu :

1. Prarigor, kondisi dimana jaringan otot menjadi lunak dan lentur. Pada fase ini ditandai dengan perubahan biokimia yaitu turunnya kandungan ATP dan keratin posfat serta berlangsungnya glikolisis.
2. Rigor mortis, fase ini umumnya sekitar 1-7 jam setelah ikan mati.
3. Pasca rigor, kondisi ini daging ikan secara bertahap dan inderawi memberikan kenampakan yang baik. Keadaan ini terjadi pada saat penyimpanan sementara pada suhu dingin (Anjarsari, 2010).

Perubahan dalam otot ikan yang terjadi selalu disertai dengan turunnya pH. Turunnya pH mengubah kondisi ikan menjadi asam yang disertai dengan berbagai reaksi eksotermis seperti glikolisis yang umumnya berpengaruh pada protein daging ikan. Akibat adanya perubahan, protein dalam otot sangat dipengaruhi oleh suhu tinggi dan pH rendah. Perubahan tersebut sangat mudah diamati seperti hilangnya warna asli dan hilangnya kemampuan mengikat air protein sarkoplasmik ikan jauh lebih stabil dari protein myofibril. Protein



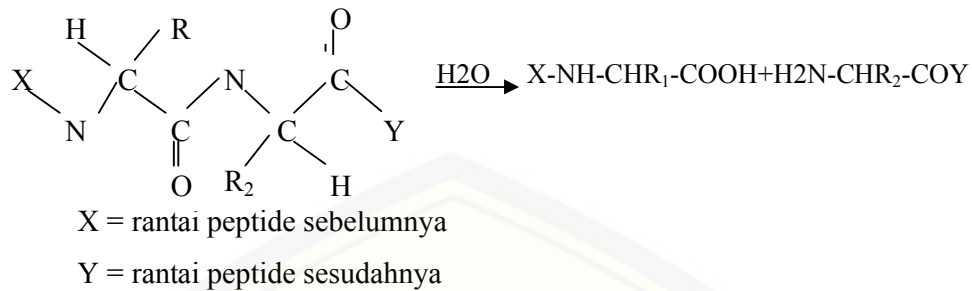
myofibril pada ikan memiliki sifat lebih stabil terhadap panas dan kelarutannya lebih tinggi dibandingkan dengan daging yang pada umumnya tidak mempengaruhi tekstur ikan (Anjarsari, 2010).

### 2.3 Hidrolisis Protein

Protein merupakan suatu zat makanan yang berfungsi sebagai bahan bakar, zat pembangun dan pengatur dalam tubuh. Protein adalah sumber asam-asam amino yang mengandung unsur-unsur C, H, O dan N. Molekul protein tersusun dari sejumlah asam amino yang saling berkaitan satu sama lain. Hidrolisis protein bertujuan untuk memecah molekul protein menjadi lebih sederhana yaitu asam amino dan peptida. Bila suatu protein dihidrolisis dengan asam, alkali maupun enzim akan dihasilkan campuran asam-asam amino (Winarno, 2002).

Proses hidrolisis protein dapat dilakukan secara kimiawi maupun enzimatis. Hidrolisis secara kimia dapat dilakukan menggunakan asam atau alkali. Hidrolisis asam merupakan proses yang sangat keras dan biasanya dilakukan pada suhu tinggi. Hidrolisis asam dapat dilakukan menggunakan asam anorganik kuat seperti HCl dan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Proses ini dapat memutuskan semua ikatan peptida yang ada dalam substrat protein sehingga dapat menghancurkan beberapa asam amino, seperti triptofan, sistein dan glutamine. Dengan adanya proses hidrolisis menggunakan asam ini, triptofan akan rusak sepenuhnya; sistein, serin dan treonin rusak sebagian; asparagin dan glutamin akan diubah menjadi bentuk asam. Selain itu pada proses netralisasi dapat membentuk garam sehingga menghasilkan produk dengan kandungan garam tinggi (BD Biosciences, 2009).

Hidrolisis menggunakan enzim proteolitik lebih efisien dan aman daripada hidrolisis secara kimiawi, karena pada proses ini tidak memerlukan suhu tinggi dan dapat memutuskan ikatan peptida secara spesifik. Hidrolisis secara enzimatis ini akan menghasilkan asam amino dan polipeptida yang bervariasi (BD Biosciences, 2009). Reaksi katalisis protease secara umum ditunjukkan pada **Gambar 2.2**.



**Gambar 2.2** Hidrolisis ikatan peptide oleh enzim protease

Faktor yang mempengaruhi kecepatan hidrolisis enzimatik adalah suhu, waktu, pH, inhibitor, serta konsentrasi enzim dan substrat. Apabila proses hidrolisis berjalan sempurna maka akan dihasilkan hidrolisat protein yang terdiri dari 18-20 asam amino (Damodaran, 1996).

#### 2.4 Hidrolisat Protein

Hidrolisat protein merupakan sumber protein alami yang dihidrolisis sehingga lebih mudah diasimilasi oleh makhluk hidup. Hidrolisis secara parsial mampu memecah molekul protein menjadi beberapa gugus amino maupun peptida melalui pemutusan ikatan rantai peptida (Rehm dan Reed, 1995).

Dengan menggunakan teknik hidrolisis akan menghasilkan senyawa-senyawa pembangkit rasa seperti asam amino L, nukleotida dan berbagai macam peptida, produk hidrolisis ini dapat menjadi sumber pembangkit cita rasa umami dan juga sebagai sumber cita rasa daging. Pada proses hidrolisis, protein yang tidak larut diubah menjadi nitrogen terlarut berupa peptida, asam amino, amoniak dan senyawa-senyawa pembentuk cita rasa (Maga, 1998).

Pengolahan ikan menjadi hidrolisat protein bertujuan untuk mengatasi kerusakan ikan dan mendapatkan bahan pangan yang lebih mudah dicerna oleh tubuh karena proteinnya telah terurai menjadi asam amino dan peptida yang lebih sederhana. Hidrolisat protein ikan merupakan protein ikan yang telah terurai menjadi turunan-turunan protein karena adanya proses hidrolisis baik secara kimiawi maupun enzimatik (Haslina dkk, 2006).

Proses produksi hidrolisat protein ikan menggunakan enzim proteolitik merupakan proses yang cukup sederhana. Langkah awal yang dilakukan adalah



pencampuran bahan baku (*raw material*) dengan air, kemudian diikuti dengan penyesuaian suhu dan pH optimal, penambahan enzim dan reaksi hidrolisis enzimatis pada waktu tertentu, selanjutnya penginaktivasian enzim, langkah terakhir adalah pengeringan atau pemekatan (Kristinsson, 2007).

Hidrolisat protein ikan memiliki peran penting dalam memperbaiki sifat fungsional dan kualitas bahan pangan. Hidrolisat protein ikan memiliki kandungan protein tinggi, asam amino lengkap, daya cerna protein yang tinggi dan sifat fungsional penting dalam pengolahan pangan, seperti *flavour enhancer*, kelarutan tinggi dalam air, serta pembentuk tekstur (Hall dan Ahmad, 1992). Hidrolisat protein ikan untuk flavor enhancer dapat dilihat pada **Tabel 2.3**.

**Tabel 2.3** Komposisi Kimia Hidrolisat Protein Ikan Untuk Flavour Enhancer

Komponen	Nilai (%)
Kadar air	5,0
Kadar abu	25,0
Kadar protein	45,0
Kadar lemak	2,0

Sumber : Thaddee dan Lyraz (1990)

## 2.5 Enzim Protease

Enzim adalah suatu kelompok protein yang menjalankan dan mengatur perubahan-perubahan kimia dalam sistem biologi (Sumardjo, 2006). Masing-masing enzim mempunyai sifat spesifik tertentu, artinya akan bekerja jika kondisi proses terkontrol untuk aktivitas enzimatikanya. Diketahui bahwa enzim adalah protein sehingga peka terhadap perubahan pH, dan pada pH yang terlalu tinggi atau terlalu rendah, enzim akan mengalami denaturasi. Oleh karena itu enzim bekerja sangat spesifik dan pH optimum untuk masing-masing enzim tidak selalu sama (Koesoemawardani, dkk., 2011).

Enzim adalah substansi yang dihasilkan oleh sel-sel hidup dan berperan sebagai katalisator pada reaksi kimia yang berlangsung dalam organisme. Katalisator adalah substansi yang mempercepat reaksi tetapi pada hasil reaksi, substansi tersebut tidak berubah. Enzim mempunyai ciri dimana kerjanya dipengaruhi oleh lingkungan. Salah satu lingkungan yang berpengaruh terhadap

kerja enzim adalah pH. pH optimal enzim adalah sekitar pH 7 (netral) dan jika medium menjadi sangat asam atau sangat alkalis enzim mengalami inaktivasi (Gaman & Sherrington, 1994).

Suasana yang terlalu asam atau alkalis menyebabkan denaturasi protein dan hilangnya secara total aktivitas enzim. Pada sel hidup, perubahan pH sangat kecil. Enzim hanya aktif pada kisaran pH yang sempit. Oleh karena itu media harus benar-benar dipelihara dengan menggunakan buffer (larutan penyangga). Jika enzim memiliki lebih dari satu substrat, maka pH optimumnya akan berbeda pada suatu substrat (Tranggono & Sutardi, 1990). Tiap enzim memiliki karakteristik pH optimal dan aktif dalam range pH yang relatif kecil, dalam banyak kasus, bentuk kurva menandakan dari keaktifan enzim berbanding pH yang terkandung di dalamnya (Almet & Trevor, 1991).

Enzim sebagai protein akan mengalami denaturasi jika suhunya dinaikkan. Akibatnya daya kerja enzim menurun. Pada suhu 45°C efek predominannya masih memperlihatkan kenaikan aktivitas sebagaimana dugaan dalam teori kinetik. Tetapi lebih dari 45°C menyebabkan denaturasi ternal lebih menonjol dan menjelang suhu 55°C fungsi katalitik enzim menjadi punah (Gaman & Sherrington, 1994). Hal ini juga terjadi karena semakin tinggi suhu semakin naik pula laju reaksi kimia baik yang dikatalisis maupun tidak. Karena itu pada suhu 40°C, larutan tidak ada gumpalan, begitu juga pada suhu ruang, sedangkan pada suhu 100°C masih ada gumpalan – gumpalan yang menunjukkan kalau enzim rusak. Pada suhu ruang, enzim masih dapat bekerja dengan baik walaupun tidak optimum (Gaman & Sherrington, 1994).

Salah satu enzim yang mempunyai peran penting dalam kehidupan adalah protease, yaitu enzim proteolitik yang bekerja memecah protein menjadi asam amino. Proteolitik termasuk kelas utama enzim hidrolase, yaitu dalam mekanisme kerjanya melibatkan air (Damodaran, 1996). Menurut Wirahadikusumah (1989), terdapat dua macam peptidase, yaitu endopeptidase dan eksopeptidase. Endopeptidase adalah enzim yang mengkatalisis pemecahan ikatan peptide pada bagian dalam rantai polipeptida. Eksopeptidase merupakan enzim yang

mengkatalisis ikatan peptide pada ujung rantai polipeptida sehingga dihasilkan ikatan peptide dan asam amino.

Enzim dapat diproduksi oleh mikroba atau bahan lainnya, misalnya bahan hewani atau nabati (Winarno, 1995). Enzim protease yang dihasilkan dari tanaman antara lain enzim papain dan kimopapain dari getah tanaman pepaya, enzim fisin dari getah tanaman *Ficus*, enzim bromelin yang diisolasi dari batang atau sari buah nanas (Winarno, 1995).

Belakangan ini telah ditemukan bahwa, enzim protease dapat dihasilkan dari tanaman biduri. Tanaman biduri (*Calotropis gigantea*) merupakan jenis tanaman semak yang memiliki ketinggian 0,5 – 3,0 m dan tumbuh di lahan kering dengan periode kering yang lama. Biduri (*Calotropis gigantea*) merupakan tanaman bergetah, dari seluruh bagian tanaman ini akan mengalir getah pada tempat yang dilukai atau dipotong. Getahnya berwarna putih, kental dan agak lengket. Tanaman biduri sampai saat ini belum banyak dimanfaatkan, bahkan tanaman ini sering dianggap gulma (Stenis, 1992). Bentuk tanaman biduri dapat dilihat pada **Gambar 2.3**.



**Gambar 2.3** Tanaman Biduri (*Calotropis gigantea*)

Hampir semua organ tubuh tanaman mengandung senyawa-senyawa kimia bermanfaat, yaitu :

1. Akar mengandung saponin, sapogenin, kalotropin, kalotoksin, uskarin, kalaktin, gigantin, dan harsa.
2. Daun mengandung bahan aktif seperti saponin, flavonoid, polifenol, tanin, dan kalsium oksalat.

3. Batang tanaman biduri mengandung tanin, saponin, dan kalsium oksalat.
4. Getah yang dihasilkan juga memuat senyawa racun jantung yang menyerupai digitalis (Dalimartha, 2003).

Ekstrak dari tanaman biduri baik pada getah, batang maupun daun sangat berpotensi digunakan sebagai sumber enzim protease (Witono, 2002a; dan Witono, 2002b). Hasil karakterisasi enzim protease biduri, berdasarkan spesifitasnya termasuk dalam golongan eksopeptidase (Witono, 2004). Menurut hasil penelitian yang telah dilakukan oleh Susanti (2005), karakteristik enzim protease biduri adalah sebagai berikut :

1. Enzim biduri dapat melakukan aktivitasnya dengan optimal pada suhu 55°C.
2. Aktivitas optimum enzim protease dari tanaman biduri pada pH 7.
3. Enzim protease biduri memiliki daya tahan yang cukup tinggi terhadap panas.
4. Enzim protease dari tanaman biduri dapat diinaktivasi pada suhu di atas 60°C dan protein enzim terdenaturasi dengan cepat pada suhu 90°C.

## **2.6 Parameter Pengamatan**

### **2.6.1 Kadar Protein Terlarut**

Kadar protein terlarut atau biasa disebut daya cerna protein merupakan kemampuan suatu protein untuk dihidrolisis menjadi asam amino oleh enzim-enzim pencernaan (protease) (Pellet dan Young, 1980). Penentuan kadar protein terlarut dapat menggunakan Metode Lowry. Prinsip kerja dari Metode Lowry adalah adanya reaksi antara protein dengan asam fosfotungstat – fosfomolibdat pada suasana alkali akan memberikan warna biru yang intensitasnya tergantung pada konsentrasi protein yang ditera (Nisa, dkk., 2007).

Jumlah protein yang terlarut selama inkubasi bergantung pada kecepatan reaksi proses hidrolisisnya yang dipengaruhi suhu, pH, konsentrasi enzim dan substrat. Empat faktor tersebut saling berkaitan. Pada kadar substrat tertentu didapatkan kecepatan reaksi yang maksimum, sehingga jika kadar substrat dinaikkan kecepatan tidak berubah. Pada pH yang terlalu tinggi atau terlalu rendah, enzim akan mengalami denaturasi. Oleh karena itu selama proses



hidrolisis dibutuhkan pH optimum enzim. Reaksi kimia berjalan lebih cepat pada suhu optimum (Koesoemawardani, dkk., 2011).

#### 2.6.2 Jumlah Produk Maillard

Reaksi Maillard merupakan reaksi antara gugus karbonil terutama dari gula pereduksi dengan gugus amino terutama dari asam amino, peptida dan protein (Whistler dan Daniel 1985). Menurut Bailey (2010) dalam Nollet (2012), reaksi maillard (pencoklatan non enzimatis) melibatkan reaksi aldehida dan amina dengan melalui berbagai reaksi. Reaksi maillard membentuk senyawa rasa makanan dan pigmen gelap. Faktor-faktor yang mempengaruhi terjadinya reaksi maillard adalah suhu, waktu, kadar air, pH, konsentrasi dan sifat reaktan. Pencegahan terjadinya reaksi maillard dapat dilakukan dengan mengurangi gula dan senyawa amino yang tidak dibutuhkan. Suhu yang tinggi menyebabkan karamelisasi gula dan pirolisis protein. Peningkatan jumlah asam amino semakin mempercepat terjadinya pembentukan warna. Gugus karbonil dari gula pereduksi dan gugus amino dari asam amino bebas merupakan komponen penting dalam reaksi maillard (Dedin, dkk., 2006).

#### 2.6.3 Daya dan Stabilitas Emulsi

Emulsi terbentuk karena terdapat keseimbangan antara komponen hidrofilik dan hidrofobik. Ikatan hidrofilik merupakan komponen polar yang berikatan dengan pelarut buffer sodium fosfat dan hidrofobik merupakan komponen non polar yang berikatan dengan minyak. Kedua komponen tersebut merupakan komponen utama pembentuk emulsi, jika salah satu komponen rusak maka akan mempengaruhi daya emulsi yang terbentuk (Kariyanto, dkk., 2014). Menurut Damodaran (1996), sifat emulsi akan tinggi apabila terjadi keseimbangan hubungan antara hidrofilik dan hidrofobik yang dapat menurunkan tegangan permukaan.

Kestabilan emulsi akan lebih baik pada derajat hidrolisis yang rendah. Hal ini karena peptida panjang yang terbentuk terserap dalam lapisan minyak dan memicu terbentuknya tetesan minyak yang kecil, akibatnya kestabilan emulsinya

lebih tinggi (Gbogouri et al., 2004 dalam Koesoemawardani, 2011). Perbedaan stabilitas emulsi pada hidrolisat yang dihasilkan oleh masing-masing enzim yang digunakan bergantung pada sifat spesifik enzim dalam memecah protein dan gugus aktifnya (Reed, 1975).

#### 2.6.4 Daya dan Stabilitas Buih

Buih merupakan disperse koloid dari fase gas dalam fase cair yang dapat terbentuk pada saat pengocokan. Mekanisme pembentukan buih yaitu terbukanya ikatan-ikatan dalam molekul protein sehingga rantai protein menjadi lebih panjang lalu udara masuk diantara molekul yang rantainya terbuka dan tertahan sehingga terjadi pengembangan volume (Winarno dan Koswara, 2002). Sifat buih protein tergantung pada sifat ekstrinsik seperti temperature, peralatan dan metode yang digunakan dalam pembuihan. Kemampuan membuih suatu zat akan kurang maksimal apabila terdapat kandungan minyak pada zat tersebut (Raikos et al., 2006).

Pada produk hidrolisat, daya buih sangat dipengaruhi oleh jumlah protein yang terpecah selama proses hidrolisis tetapi tidak dapat untuk menentukan stabilitas buih atau sebaliknya. Semakin lama inkubasi pada proses hidrolisis akan menurunkan daya buih pada produk hidrolisat yang dihasilkan. Selama inkubasi terbentuk peptide hidropobik yang dapat mengabsorpsi antara fase udara dan air sehingga dapat membentuk buih yang banyak. Jika waktu hidrolisis bertambah peptide hidropobiknya berkurang dan diduga terjadi pengurangan berat molekulnya yang dapat meningkatkan kestabilan buih yang dihasilkan. Daya buih juga dipengaruhi oleh jumlah protein yang terlarut. Hidrolisat yang mempunyai nilai protein terlarut tinggi maka daya buihnya juga tinggi (Koesoemawardani dkk., 2011).

Stabilitas buih merupakan ukuran kemampuan struktur buih untuk bertahan kokoh atau tidak mencair selama waktu tertentu. Indikator kestabilan buih adalah besarnya tirsan buih selama waktu tertentu dan dinyatakan dalam bobot, volume atau derajat pencairan buih (Stadelman dan Cotterill, 1995). Stabilitas buih merupakan kemampuan protein untuk menstabilkan buih melawan

gravitasi dan tekanan osmotik. Stabilitas buih mempunyai peran dan pengaruh yang besar terhadap mutu produk yang membutuhkan kestabilan buih yang tinggi (Jiwanggoro, dkk. 2013).

#### 2.6.5 Tingkat Ketengikan

Ketengikan terjadi karena asam lemak diubah akibat hidrolisis atau oksidasi menjadi hidrokarbon, alkanal atau keton serta sedikit epoksi dan alkohol (alkanol). Bau yang kurang sedap muncul akibat campuran dari berbagai komponen. Hal ini disebabkan oleh autooksidasi radikal asam lemak tidak jenuh dalam lemak. Otoksidasi dimulai dengan pembentukan radikal-radikal bebas yang disebabkan oleh faktor-faktor yang dapat mempercepat reaksi seperti cahaya, panas, peroksida lemak atau hidroperoksida, logam-logam berat seperti Cu, Fe, Co dan Mn, logam porfirin seperti hematin, hemoglobin, mioglobin, klorofil dan enzim-enzim lipoksidase (Winarno, 1997).

Ketengikan terjadi ketika penyimpanan lemak dan terjadi reaksi hidrolisis dengan air. Proses hidrolisis akan menghasilkan asam lemak bebas yang akan menggabungkan setiap molekul air dengan molekul lemak, sehingga salah satu asam lemak bebas dapat dibebaskan. Ukuran dari asam lemak yang dibebaskan penting dalam menentukan ketengikan. Asam lemak rantai pendek dapat menyebabkan rasa dan bau yang terkait dengan ketengikan. Jika asam lemak rantai panjang yang dibebaskan maka tidak berkontribusi pada rasa dan bau (Murano, 2003).

Asam lemak tak jenuh yang bereaksi dengan oksigen membentuk hidroperoksida. Meskipun tidak menyebabkan rasa dan bau, hidroperoksida yang terurai lebih lanjut akan menghasilkan bau, aldehida, keton, asa, dan alkohol penyebab ketengikan. Ketengikan dapat dicegah dengan cara menyimpan produk pada tempat dingin yang jauh dari cahaya dan kontaminasi logam. Selain itu, kandungan antioksidan efektif dalam mencegah ketengikan karena antioksidan menyumbang atom hydrogen dengan radikal asam lemak yang menyumbang molekul lemak asli dari radikal lipid sehingga dapat menghentikan reaksi berantai (Murano, 2003).



Molekul-molekul lemak yang mengandung radikal asam lemak tidak jenuh mengalami oksidasi dan menjadi tengik. Bau tengik yang tidak sedap tersebut disebabkan oleh pembentukan senyawa-senyawa hasil pemecahan hidroperoksida. Radikal bebas dengan  $O_2$  membentuk peroksida aktif yang dapat membentuk hidroperoksida yang bersifat sangat tidak stabil dan mudah pecah menjadi senyawa dengan rantai karbon yang lebih pendek oleh radiasi energi tinggi, energi panas, katalis logam atau enzim. Senyawa-senyawa dengan rantai C lebih pendek ini adalah asam-asam lemak, aldehida-aldehida dan keton yang bersifat volatil dan menimbulkan bau tengik pada lemak (Winarno, 1997).

Beberapa aldehid volatil terbentuk pada autooksidasi dari asam lemak tak jenuh yang merupakan kontributor terbesar dalam memberi bau yang tidak enak dalam produk makanan. Contohnya oleat menghasilkan 2-dekenal, nonenal dan oktanal, linoleat menghasilkan heksanol dan 3-nonenal. Demikian juga dengan keton seperti 2-butanon, 1-penten-3-on dan sebagainya (Ketaren, 2005). Ketengikan dapat dicegah oleh beberapa macam senyawa organik yang fungsinya menghambat proses oksidasi, yang disebut dengan antioksidan (Kusrahayu, dkk., 2009).

Tingkat ketengikan dapat ditentukan dengan menggunakan Uji Asam Tiobarbiturat (TBA). Pengujian tersebut dipakai untuk menentukan adanya ketengikan dimana lemak yang tengik akan bereaksi dengan asam TBA menghasilkan warna merah dan intensitas warna ini menunjukkan derajat ketengikan (Winarno, 1984).

## BAB 3. METODE PENELITIAN

### 3.1 Bahan dan Alat Penelitian

#### 3.1.1 Bahan Penelitian

Bahan baku yang digunakan pada penelitian ini adalah ikan wader, enzim biduri yang didapat dari getah tanaman biduri, jeruk nipis dan enzim papain yang didapat dari getah buah pepaya. Bahan kimia yang digunakan adalah aquades, reagen Mix-Lowry ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  anhidrat,  $\text{CuSO}_4$ ), follin,  $\text{NaOH}$  0,1 N, *Trichloroacetic acid* (TCA), Selenium,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat,  $\text{NaOH}$  40%, Asam borat ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) 4%, indikator *methyl red* dan *methyl blue*, BSA (*Bovine Serum Albumin*), *soluble casein*,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pelarut petroleum benzena, minyak goreng, SDS, Reagen TBA, isobutanol dan etanol.

#### 3.1.2 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi blender *stainless steel* merek GMC, sentrifuse dan tabungnya, gelas ukur (*pyrex*), beaker glass (*pyrex*), pipet tetes, pipet mikro (Surepette), pipet ukur, ball pipet, tabung reaksi (*pyrex*), labu ukur (*pyrex*), mortar, kuvet, pH meter, vortex (Thermolyne type 16700), lemari pendingin, waterbath (GFL 1083), neraca analitik (Ohaus), pemanas listrik, spatula, oven, labu kjeldahl, aluminium foil, spectrophotometer, destilator, buret, desikator, tanur pengabuan (Nabertherm), kertas saring, soxhlet, dan aerator.

### 3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia dan Biokimia Hasil Pertanian, Laboratorium Rekayasa Proses dan Hasil Pertanian serta Laboratorium Analisa Terpadu Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember, pada bulan Maret hingga Agustus 2015.

### 3.3 Metode Penelitian

#### 3.3.1 Pelaksanaan Penelitian

Tahap awal pembuatan enzim biduri dilakukan dengan cara mengambil getah biduri dari batang tanaman biduri yang selanjutnya ditambahkan buffer phosphat 0,5 M pH 7 dengan perbandingan 1 bagian getah dan 1 bagian buffer phosphate. Pemisahan supernatant dan endapan (sebagian besar mengandung gum dan komponen selain protein) dilakukan dengan sentrifus dingin suhu 4°C pada kecepatan 8000 rpm selama 10 menit. Supernatant cair ini selanjutnya digunakan untuk hidrolisis.

Pembuatan hidrolisat kering ikan wader dimulai dengan memfillet ikan wader untuk memisahkan daging dengan kepala, kotoran, sisik dan tulangnya. Untuk memudahkan dalam proses filleting, ikan wader direndam dalam larutan enzim papain. Sebelumnya ikan wader terlebih dulu direndam dengan air jeruk untuk menghilangkan bau amis pada ikan. Daging ikan yang didapat dari proses filleting kemudian ditimbang sebanyak 100 gram dan dilakukan pengukusan selama 10 menit. Fungsi dari pengukusan ini adalah untuk melunakkan daging ikan agar mudah dihancurkan dan memunculkan flavor ikan. Setelah itu dihancurkan dengan ditambahkan aquades dengan perbandingan aquades dan bahan 2:1 (berat/volume) dari berat daging ikan wader sebelum dilakukan pengukusan. Suspensi ikan wader diatur pHnya dengan ditambahkan NaOH 0,1 N hingga mencapai pH 7. Pengaturan pH ini bertujuan agar enzim dapat bekerja optimal dalam menghidrolisis protein karena enzim biduri yang digunakan optimal pada pH 7. Suspensi ikan wader dengan pH 7 ditambahkan enzim biduri dengan berbagai konsentrasi yaitu 1%; 2% dan 3%. Konsentrasi enzim biduri yang ditambahkan berdasarkan berat daging ikan wader sebelum dilakukan pengukusan. Suspensi ikan wader yang telah ditambahkan dengan enzim kemudian dilakukan hidrolisis dengan berbagai variasi waktu yaitu 0 jam, 1,5 jam dan 3 jam. Selanjutnya dididihkan dengan suhu 100°C selama 10 menit untuk menginaktifkan enzim. Hidrolisat yang dihasilkan dikeringkan dalam oven selama kurang lebih 18 jam pada suhu 60 °C. Setelah kering hidrolisat ikan wader dilakukan penumbukan untuk menghaluskan dengan menggunakan mortar.

Diagram alir pembuatan hidrolisat kering ikan wader dapat dilihat pada **Gambar 3.1**. Hidrolisat kering ikan wader yang didapat dianalisis proksimat (kadar air, protein, lemak dan abu) (AOAC, 2005), kadar protein terlarut (Metode Lowry; Sudarmadji, 1997), Jumlah Produk Maillard (Manzocco dkk., 1999), Tingkat Ketengikan (Subagio, 2002), Total padatan terlarut, Warna, Daya Emulsi dan Stabilitas Emulsi (Parkington *et al.*, 2000), Daya Buih dan Stabilitas Buih (Subagio, dkk., 2003).

### 3.3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan percobaan yang digunakan pada penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial dengan 2 faktor dan masing-masing diulang sebanyak 3 kali.

1. Faktor pertama yaitu konsentrasi enzim protease biduri (B) yang terdiri dari :
  - B1: 1%
  - B2: 2%
  - B3: 3%
2. Faktor kedua yaitu waktu hidrolisis (T) yang terdiri dari :
  - T1: 0 jam
  - T2: 1,5 jam
  - T3: 3 jam

Dari kedua faktor tersebut akan diperoleh 9 kombinasi perlakuan. Adapun kombinasi perlakuan tersebut adalah sebagai berikut :

B1T1	B1T2	B1T3
B2T1	B2T2	B2T3
B3T1	B3T2	B3T3

Adapun model linier rancangan dalam RAL, yaitu sebagai berikut :

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

$$i = 1, 2, \dots, a; j = 1, 2, \dots, b; c = 1, 2, \dots, r$$

dimana:

$Y_{ijk}$  : pengamatan pada satuan percobaan ke-k yang memperoleh kombinasi perlakuan taraf ke-I dari faktor B dan taraf ke-j dari faktor T

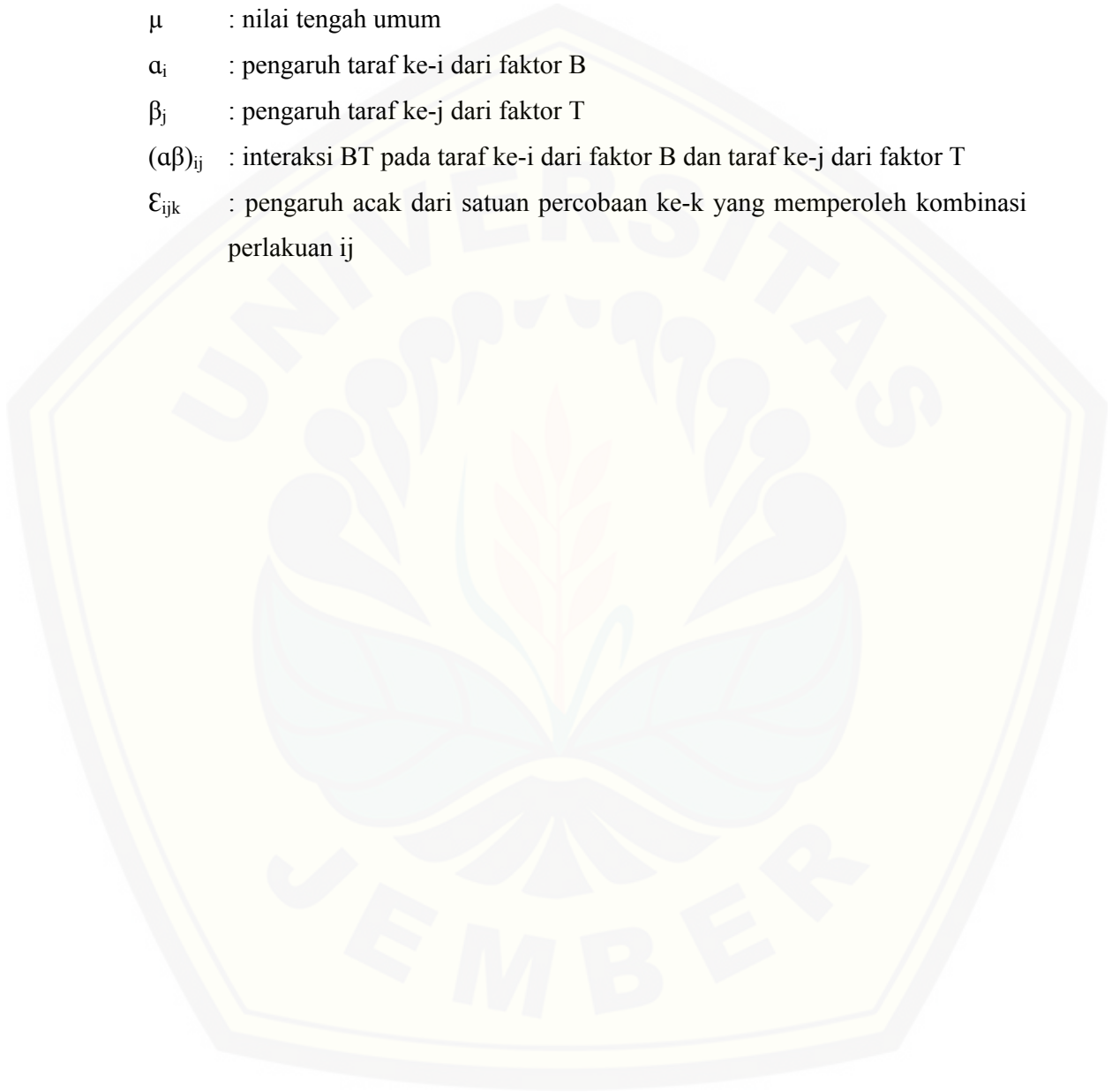
$\mu$  : nilai tengah umum

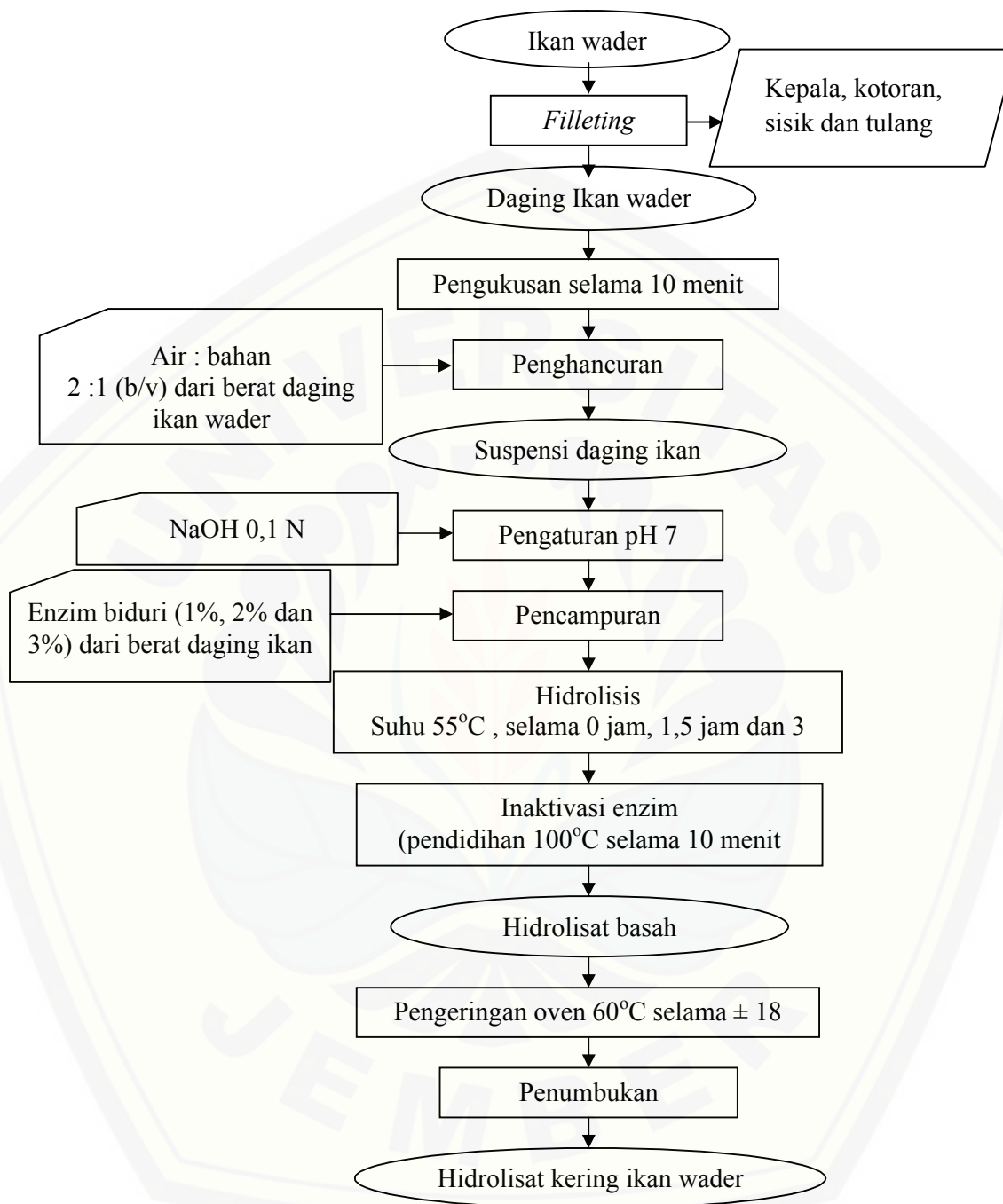
$\alpha_i$  : pengaruh taraf ke-i dari faktor B

$\beta_j$  : pengaruh taraf ke-j dari faktor T

$(\alpha\beta)_{ij}$  : interaksi BT pada taraf ke-i dari faktor B dan taraf ke-j dari faktor T

$\epsilon_{ijk}$  : pengaruh acak dari satuan percobaan ke-k yang memperoleh kombinasi perlakuan ij





**Gambar 3.1** Diagram Alir Pembuatan Hidrolisat Kering Ikan Wader



### 3.4 Parameter Analisis

Parameter yang diamati dalam penelitian ini meliputi :

1. Proksimat
  - a. Kadar Air (AOAC, 2005)
  - b. Kadar Abu (AOAC, 2005)
  - c. Kadar lemak (AOAC, 2005)
  - d. Kadar Protein (Sudarmadji, 1997)
2. Kadar Protein Terlarut (Metode Lowry; Sudarmadji, 1997)
3. Jumlah Produk Maillard (Manzocco dkk., 1999)
4. Tingkat Ketengikan (Subagio, 2002)
5. Total Padatan Terlarut (Sudarmadji *et al.*, 1986)
6. Warna (Munsel, 1997)
7. Daya Emulsi dan Stabilitas Emulsi (Parkington *et al.*, 2000)
8. Daya Buih dan Stabilitas Buih (Subagio, dkk., 2003)

### 3.5 Prosedur Analisa

#### 3.5.1 Proksimat

- a. Kadar Air (AOAC, 2005)

Analisis kadar air dilakukan dengan penguapan menggunakan oven. Tahap pertama yang dilakukan adalah mengeringkan botol timbang pada suhu 102-105 °C selama 1 jam. Botol timbang tersebut diletakkan dalam desikator kurang lebih 15 menit hingga dingin kemudian ditimbang (A gram). Cawan dimasukkan sampel sebanyak 1 gram kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu 102-105 °C selama 6 jam (B gram). Setelah 6 jam cawan tersebut dimasukkan ke dalam desikator hingga dingin kemudian ditimbang bobotnya hingga konstan (C gram). Perhitungan kadar air :

$$\% \text{kadar air} = \frac{B - C}{B - A} \times 100\%$$

Keterangan :

A = Berat cawan kosong (gram)

B = Berat cawan yang diisi sampel (gram) sebelum dioven

C = Berat cawan dengan sampel (gram) setelah dioven

## b. Kadar Abu (AOAC, 2005)

Analisis kadar abu dilakukan dengan mengabukan sampel di dalam tanur. Tahap pertama cawan abu porselen dikeringkan di dalam oven selama 1 jam pada suhu 105°C, lalu didinginkan dalam desikator kemudian ditimbang (A gram). Sampel ditimbang sebanyak 1 gram dan dimasukkan ke dalam cawan pengabuan selanjutnya ditimbang (B gram). Setelah itu dimasukkan ke dalam tanur pengabuan dengan suhu 300 °C hingga tidak berasap lagi. Setelah asap hilang selanjutnya suhu dinaikkan menjadi 600°C dan sampel diabukan selama 4 jam. Proses pengabuan dilakukan sampai abu berwarna putih. Setelah itu cawan didinginkan dalam desikator selama 15 menit, kemudian ditimbang hingga didapatkan berat yang konstan (C gram).

Perhitungan kadar abu :

$$\% \text{kadar abu} = \frac{C - A}{B - A} \times 100\%$$

Keterangan :

A = Berat cawan kosong (gram)

B = Berat cawan yang diisi sampel (gram) sebelum di tanur

C = Berat cawan dengan sampel (gram) setelah ditanur

c. Kadar Lemak (Sudarmadji *et al.*, 1997)

Analisis kadar lemak dilakukan dengan metode *sokhlet*. Prinsipnya adalah lemak yang terdapat dalam sampel diekstrak dengan menggunakan pelarut lemak non polar. Prosedur analisis kadar lemak sebagai berikut : kertas saring yang akan digunakan dioven pada suhu 100°C selama ± 1 jam, selanjutnya dimasukkan ke dalam desikator selama 15 menit kemudian ditimbang (A gram). Sampel sebanyak 1 gram ditimbang dalam kertas saring (B gram) selanjutnya dibungkus. Sampel dan kertas saring selanjutnya dioven pada suhu 100°C selama 24 jam dan ditimbang (C gram). Kemudian diekstraksi dengan *soxhlet* menggunakan pelarut *petroleum benzene* secukupnya selama 5 jam. Sampel yang telah diekstraksi kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu 60°C selama 24 jam dan ditimbang hingga konstan (D gram).

Kadar lemak dihitung dengan rumus:

$$\% \text{kadar lemak} = \frac{C - D}{B - A} \times 100\%$$

Keterangan :

A = Berat Kertas saring (gram)

B = Berat kertas saring + Sampel (gram)

C = Berat kertas saring + sampel setelah dioven (gram)

D = Berat kertas saring + sampel setelah di *soxhlet* (gram)

d. Kadar Protein (Sudarmadji *et al.*, 1997)

Prinsip dari analisis protein, yaitu untuk mengetahui kandungan protein kasar (*crude protein*) pada suatu bahan. Tahap-tahap yang dilakukan dalam analisis protein terdiri dari tiga tahap, yaitu destruksi, destilasi dan titrasi. Pengukuran kadar protein dilakukan dengan metode mikro Kjeldahl. Sampel ditimbang sebanyak 0,5 gram, kemudian dimasukkan ke dalam labu Kjeldahl, lalu ditambahkan 1 gram selenium dan 10 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat. Sampel didestruksi pada suhu 410 °C selama kurang lebih 1 jam sampai larutan jernih lalu didinginkan. Setelah dingin, ke dalam labu Kjeldahl ditambahkan 50 ml akuades dan 20 ml NaOH 40%, kemudian dilakukan proses destilasi dengan suhu destilator 100 °C. Hasil destilasi ditampung dalam labu Erlenmeyer 250 ml yang berisi campuran 30 ml asam borat (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) 4% dan 2 tetes indikator MmMb yang berwarna biru. Setelah volume destilat mencapai 40 ml dan berwarna kehijauan, maka proses destilasi dihentikan. Lalu destilat dititrasi dengan HCl 0,02 N sampai terjadi perubahan warna biru keunguan. Volume titran dibaca dan dicatat. Larutan blanko dianalisis seperti sampel.

Kadar protein dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\%N = \frac{(\text{ml HCl} - \text{ml blanko}) \times N \text{ HCl} \times 14,008}{\text{gram sampel} \times 1000} \times 100\%$$

Keterangan :

% Kadar protein = %N x faktor konversi

Faktor konversi = 6,25

### 3.5.2 Kadar Protein Terlarut (Metode Lowry; Sudarmadji, 1997)

Menimbang sampel sebanyak 0,1 gram. Kemudian dilarutkan dengan aquades 10 ml. sampel disentrifuge selama 5 menit, diambil 0,125 ml filtrate direaksikan dengan reagen Mix-Lowry 2,5 ml dan dibiarkan selama 10 menit. Kemudian ditambahkan follin 0,25 ml dan dibiarkan selama 30 menit. Ditambahkan dengan aquades sampai volume 5 ml. Kemudian ditera absorbansinya dengan spectrophotometer pada panjang gelombang 750 nm. Data absorbansi diplotkan pada kurva standar BSA untuk dihitung kadar proteinnya.

### 3.5.3 Jumlah Produk Maillard (Manzocco dkk., 1999)

Sampel ditimbang sebanyak 0,1 gram dan dilarutkan ke dalam 10 ml aquadest kemudian divortex selama 3 menit. Kemudian ditera absorbansinya pada panjang gelombang 420 nm.

### 3.5.4 Tingkat Ketengikan (Subagio, 2002)

Penentuan ketengikan dilakukan dengan cara 0,05 gram sampel dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambah 1 ml reagen TBA. Kemudian dipanaskan dalam air mendidih selama  $\pm$  15 menit. Setelah dingin ditambahkan 1 ml isobutanol dan ditera volumenya menjadi 5 ml dengan etanol. Selanjutnya dicampur menggunakan vortex selama 5 menit. Filtrat yang dihasilkan ditera absorbansinya pada panjang gelombang 535 nm. Cara yang sama dibuat untuk blanko. Perhitungan nilai TBA adalah sebagai berikut :

$$\text{Mmol/kgMDA} = \frac{A_{\text{cm}} (\text{sampel} - \text{blanko}) \cdot 1000 \text{ nM/M} \cdot \text{ml sampel} \cdot 1000 \text{g/kg}}{1,56 \times 10^4 \text{ M} \cdot \text{cm} \cdot \text{g bahan} \cdot 1000 \text{ ml/liter}}$$

Keterangan : MDA = Malonaldehyde

A = Absorbansi

### 3.5.5 Total Padatan Terlarut (Sudarmadji *et al.*, 1986)

Diambil bahan dengan menggunakan pipet tetes, substrat ditetaskan diatas kaca handrefractometer lalu dilihat titik terang dan gelapnya. Angka yang tertera tersebut merupakan total padatan terlarut atau soluble solid ( $^{\circ}$ Brix).

### 3.5.6 Warna (Munsell, 1997)

Penentuan warna dilakukan menggunakan alat *colour reader*. Pengukuran warna dibaca pada parameter  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  di titik yang berbeda.  $L^*$  menunjukkan derajat kecerahan dari hitam (0) hingga putih (100).  $a^*$  mendeskripsikan warna merah-hijau dengan nilai  $a^*$  positif mengindikasikan kemerahan dan  $a^*$  negatif mengindikasikan kehijauan. Sedangkan  $b^*$  mendeskripsikan warna kuning-biru dengan nilai  $b^*$  positif mengidentifikasi kekuningan dan  $b^*$  negatif mengindikasikan kebiruan. Ujung lensa *colour reader* ditempelkan pada permukaan sampel yang akan dianalisa.

**Tabel 3.1** Deskripsi warna berdasarkan °Hue (Hutching, 1999)

°Hue [arc tan (b/a)]	Deskripsi Warna
18 – 54	Red (R)
54 – 90	Yellow Red (YR)
90 – 126	Yellow (Y)
126 – 162	Yellow Green (YG)
162 – 198	Green (G)
198 – 234	Blue Green (BG)
234 – 270	Blue (B)
270 – 306	Blue Purple (BP)
306 – 342	Purple (P)
342 – 18	Red Purple (RP)

### 3.5.7 Daya Emulsi dan Stabilitas Emulsi (Parkington *et al.*, 2000)

Pengukuran daya emulsi dilakukan dengan menimbang sampel sebanyak 0,1 gram dan ditambahkan 100 ml buffer phospat 0,05 M pH 7. Setelah itu dilakukan pengadukan menggunakan stirrer selama 15 menit. Kemudian ditambahkan 25 ml minyak goreng dan dilakukan pencampuran menggunakan blender selama 3 menit. Untuk pengukuran daya emulsi, setelah dicampurkan menggunakan blender langsung diambil 1 ml, sedangkan pengukuran stabilitas emulsi dilakukan dengan pengambilan 1 ml setelah 10 menit kemudian. Masing-masing ditambahkan 5 ml SDS 0,1 % dan dihomogenkan menggunakan vortex. Setelah itu dilakukan pembacaan absorbansi pada panjang gelombang 500 nm. Selanjutnya dilakukan perhitungan daya dan stabilitas emulsi dengan rumus sebagai berikut.



$$\text{EAI (m}^2/\text{g)} = \frac{2 \times 2,303}{c \times (1 - \phi) \times 10} \times \text{abs} \times \text{dilution}$$

Keterangan:

- c = konsentrasi protein (g/ ml)  
 $\phi$  = fraksi volume minyak (ml/ml) dari emulsi  
 abs = absorbansi  
 dilution = fraksi larutan (SDS + emulsi)  
 EAI = *Emulsifying Activity Index* (indeks aktivitas emulsi)

$$\text{ESI (menit)} = \frac{T \times \Delta t}{\Delta T}$$

Keterangan:

- T = absorbansi pada waktu 0 menit  
 $\Delta t$  = selisih waktu yang akan dihitung 10 mnt  
 $\Delta T$  = selisih absorbansi pada waktu 0 menit dengan absorpsi pada waktu yang akan dihitung  
 ESI = *Emulsifying Stability Index*

### 3.5.8 Daya Buih dan Stabilitas Buih (Subagio, dkk., 2003)

Penentuan daya buih dan stabilitas buih ditentukan dengan cara menimbang sampel sebanyak 0,1 gram dan ditambahkan 25 ml *buffer phosphate* 0,05 M pH 7. Kemudian dimasukkan ke dalam gelas ukur 100 ml. Pada saat memasukkan ke dalam gelas ukur, catat volume yang terdapat pada gelas ukur sebagai volume awal sampel, kemudian letakkan aerator selama 1 menit sebagai pembentuk buih dan catat volume buih selama 1 menit. setelah volume diketahui, hentikan aerator dan tunggu selama 2 menit dan catat volume akhir sampel tersebut.

$$\text{Daya buih} = \frac{\text{vol. setelah aerasi} - \text{volume awal}}{\text{berat sampel}}$$

$$\text{Stabilitas buih} = \frac{\text{vol. sisa buih}}{\text{vol awal}} \times 100\%$$

Keterangan :

- Vol. sisa buih = vol. setelah 2 menit – vol. awal 0 menit  
 Vol. awal = vol. setelah 1 menit – vol. awal 0 menit