



AKTIVITAS ANTIOKSIDAN HIDROLISAT PROTEIN PRF (*PROTEIN RICH FLOUR*) KORO PEDANG (*Canavalia ensiformis* L.) HASIL HIDROLISIS MENGGUNAKAN PROTEASE BIDURI (*Calotropis gigantea*)

SKRIPSI

Oleh:

Ika Wahyuni

141710101034

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

2018



AKTIVITAS ANTIOKSIDAN HIDROLISAT PROTEIN PRF (*PROTEIN RICH FLOUR*) KORO PEDANG (*Canavalia ensiformis* L.) HASIL HIDROLISIS MENGGUNAKAN PROTEASE BIDURI (*Calotropis gigantea*)

SKRIPSI

diajukan guna memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Pendidikan Strata Satu (S1) Jurusan Teknologi Hasil Pertanian dan mencapai gelar Sarjana Teknologi Pertanian

Oleh:

Ika Wahyuni

141710101034

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

2018

PERSEMBAHAN

Segala puji dan syukur yang tak terhingga penulis ucapkan kepada Allah SWT atas seluruh nikmat-Nya serta sholawat kepada Nabi Muhammad SAW yang selalu menjadi suri tauladan hingga akhir zaman, sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik. Skripsi ini penulis persembahkan untuk:

1. ALLAH SWT yang telah memberikan hidayah dan kemudahan kesabaran yang melimpah dalam melaksanakan penelitian ini;
2. Orang tuaku yang selalu disampingku memberikan semangat yang berkobar-kobar dan keikhlasan yang tak ada habisnya;
3. Adikku David Dwi Wahyudi dan Tria Oktavia Wijayanti serta keluarga yang berada di Jember yang memberikan semangat setiap hari untuk terus berkarya di Laboratorium;
4. Keluargaku yang berada di Banyuwangi, Jakarta, Semarang dan Ponorogo yang selalu menyemangatiku dan memberikan nasehat-nasehat kehidupan untuk masa depanku kelak;
5. Teman sekaligus partner tercinta Mevia Rizqi Dayinta yang selalu bertemu dan berkomunikasi setiap hari dalam melakukan bisnis *online* sekaligus teman dari Sekolah Menengah Pertama hingga masa perkuliahan;
6. Semua guru saya mulai dari TK sampai dosen di perguruan tinggi yang terhormat, telah memberikan ilmu yang bermanfaat serta membimbing dengan penuh kasih sayang dan kesabaran;
7. Jajaran Dekanat Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember;
8. Teman-teman seperjuangan FTP khususnya anak didik Prof. Yuli Witono yaitu Langit, Lilik, Febri, Danar, Yuvita yang selalu menemani dan membuat nyaman berada di Laboratorium;
9. Teman-teman THP A 2014 yang menemani saya dalam 4 tahun terakhir selama menuntut ilmu di FTP UNEJ;
10. Almamater tercinta, Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.

MOTTO

*“It’s okay if you get chocked up, nobody will blame you ..it’s okay to make a
mistake now or then because everyone has done so, although word*

“IT’s OKAY”

are only comforting words...



PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

nama : Ika Wahyuni

NIM : 141710101034

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Aktivitas Antioksidan Hidrolisat Protein PRF (*Protein Rich Flour*) Koro Pedang (*Canavalia ensiformis* L.) Hasil Hidrolisis Menggunakan Protease Biduri (*Calotropis gigantea*)” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan disebutkan sumbernya dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya tiruan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi. Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapatkan sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 05 Agustus 2018

Yang menyatakan,

Ika Wahyuni

NIM 141710101034

SKRIPSI

AKTIVITAS ANTIOKSIDAN HIDROLISAT PROTEIN PRF (*PROTEIN RICH FLOUR*) KORO PEDANG (*Canavalia ensiformis* L.) HASIL HIDROLISIS MENGGUNAKAN PROTEASE BIDURI (*Calotropis gigantea*)

Oleh
Ika Wahyuni
141710101034

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : **Prof. Dr. Yuli Witono., S.TP., M.P**
Dosen Pembimbing Anggota : **Ahmad Nafi'., S.TP., M.P**

LEMBAR PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Aktivitas Antioksidan Hidrolisat Protein PRF (*Protein Rich Flour*) Koro Pedang (*Canavalia ensiformis* L.) Hasil Hidrolisis Menggunakan Protease Biduri (*Calotropis gigantea*)” karya Ika Wahyuni (141710101034), telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember pada :

hari, tanggal : 30 Juli 2018

tempat : Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama

Dosen Pembimbing Anggota

Prof.Dr.Yuli Witono, S.TP.,M.P
NIP 196912121998021001

Ahmad Nafi', S.TP.,M.P
NIP 197804032003121003

Tim Penguji

Ketua,

Anggota,

Dr. Ir. Sih Yuwanti, M.P
NIP 1969507081994032002

Dr. Maria Belgis, S.T.P, M.P
NIDN 0027127806

Mengesahkan,

Dekan Fakultas Teknologi Pertanian
Universitas Jember

Dr. Siswovo Soekarno, S.TP., M.Eng.

NIP. 196809231994031009

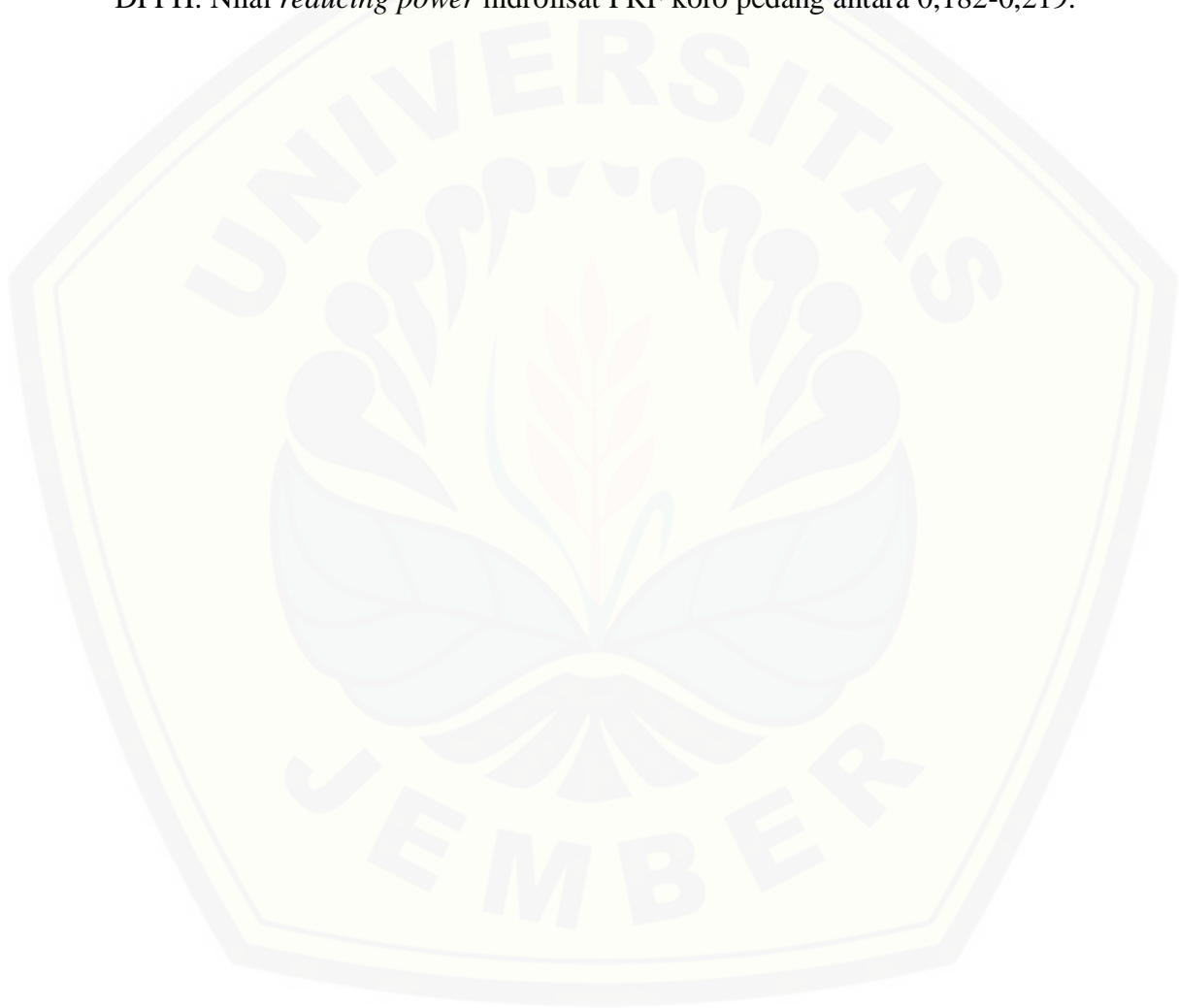
RINGKASAN

“Aktivitas Antioksidan Hidrolisat Protein PRF (*Protein Rich Flour*) Koro Pedang (*Canavalia ensiformis* L.) Hasil Hidrolisis Menggunakan Protease Biduri (*Calotropis gigantea*)”; Ika Wahyuni, 141710101034; 2018; 82 halaman; Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.

Antioksidan didefinisikan sebagai senyawa yang menghambat oksidasi dengan cara bereaksi dengan radikal bebas reaktif membentuk radikal bebas stabil. Senyawa antioksidan alami telah banyak diidentifikasi dari bahan pangan nabati misalnya kedelai atau hidrolisat protein dari bahan pangan nabati tertentu yang mengandung senyawa bioaktif peptida. Produk hidrolisat terbukti menunjukkan potensi sebagai antioksidan. Selain hidrolisat protein ikan, hidrolisat protein dari tanaman atau nabati juga telah banyak diteliti sebagai sumber antioksidan. Hidrolisat protein pada penelitian ini diperoleh dari proses hidrolisis enzimatis menggunakan getah tanaman biduri yang merupakan salah satu produk lokal dengan kandungan enzim protease yang dapat mengkatalisa reaksi pemecahan rantai polipeptida pada protein. Hidrolisat protein nabati bisa didapatkan dari koro pedang yang mempunyai kandungan protein cukup tinggi. Tingginya kandungan protein pada koro pedang dapat digunakan sebagai bahan dasar dari pembuatan *Protein Rich Flour* (PRF) atau tepung kaya protein. PRF dapat dimanfaatkan karena memiliki potensi untuk diproduksi sebagai hidrolisat protein yang mempunyai aktivitas antioksidan. Masih terbatasnya informasi dan pemanfaatan PRF koro pedang sebagai sumber antioksidan alami, mendorong dilakukannya penelitian ini bertujuan untuk melihat pengaruh konsentrasi enzim dan lama hidrolisis terhadap aktivitas antioksidan dari hidrolisat PRF yang dihidrolisis menggunakan protease biduri. Pengaruh tersebut meliputi kadar protein, derajat hidrolisis, berat molekul, komposisi asam amino, aktivitas antioksidan yang terdiri dari *Radical Scavenging Activity*, IC_{50} dan *Reducing Power*.

Rancangan penelitian ini menggunakan dua faktor, faktor A adalah lama hidrolisis dan faktor B adalah penambahan konsentrasi enzim biduri. Proses pembuatan hidrolisat protein PRF koro pedang diawali dengan perendaman biji koro selama 3 hari, penghancuran, pengendapan protein di titik isoelektrik, pengovenan dan pengayakan. PRF koro pedang dalam bentuk bubuk kemudian dihidrolisis suhu 55 °C dengan lama hidrolisis dan penambahan konsentrasi enzim biduri sesuai perlakuan. Hidrolisat basah yang diperoleh dikeringkan dengan metode kering beku yaitu *freeze drying* dan dianalisis kadar protein, derajat hidrolisis, distribusi berat molekul, komposisi asam amino dan aktivitas antioksidan.

Hasil penelitian menunjukkan kadar protein hidrolisat PRF koro pedang antara 39,067-70,436%. Nilai derajat hidrolisis antara 9,034-30,421%. Distribusi berat molekul hidrolisat PRF digunakan sampel perlakuan terbaik yaitu pada sampel dengan penambahan konsentrasi enzim 3% dan lama hidrolisis 3 jam yaitu antara 18,07-127,35 kDa. Komposisi asam amino hidrolisat protein koro pedang menghasilkan 15 asam amino dan nilai asam amino paling tinggi yaitu asam glutamat sebesar 11,05%. Nilai %RSA (*Radical Scavenging Activity*) hidrolisat menghasilkan nilai antara 7,932-14,690 %, nilai IC_{50} pada sampel perlakuan terbaik adalah 3218,220 ppm dapat menghambat (%RSA) >50% radikal bebas DPPH. Nilai *reducing power* hidrolisat PRF koro pedang antara 0,182-0,219.



SUMMARY

“Antioxidant Activity of Protein Hydrolysate Prepared from Jack Bean (*Canavalia ensiformis* L.) Protein Rich Flour Hydrolyzed by Biduri (*Calotropis gigantea*) Protease”; Ika Wahyuni, 141710101034; 2018; 84 pages; Agricultural Product Technology Department, Faculty of Agricultural Technology, Jember University.

An antioxidant is a compound that able to prevent an oxidation reaction in our body from free radicals. Natural antioxidants has been identified such as soybean, wheat, pea seed, peanut or protein hydrolysates from food protein that obtained of peptide bioactive compound. Hydrolysate products have shown that has a potential antioxidant. Fish protein hydrolysates prove the existing of an antioxidant activity, but hydrolysates from plant-derived proteins also have antioxidant properties. Protein hydrolysates are produced from sap of biduri plants from the local products with the content of protease enzymes that can catalyze the reaction of breaking the polypeptide chain in protein. Hydrolysates from plant-derived protein are obtained from Jack Bean that can be utilized because it has a potential to be produced as a protein hydrolysate which contains of antioxidant properties. Jack bean could be processed as a raw material of Protein Rich Flour. The purpose of this study was to produce hydrolysates Jack bean PRF using biduri protease that shows an antioxidant activity. The limited information and utilization of Jack bean PRF as a source of natural antioxidants encourages this research to determine the enzyme concentration and hydrolysis time. The effect including protein content, degree of hydrolysis, molecular weight, amino acid composition and antioxidant activities.

The experimental design of this study was used two factors, the A factor was the hydrolysis time and the B factor was biduri enzyme concentration. The production of protein hydrolysates began with soaked the seed of jack bean for 3 days, shattered, sunk the protein to isoelectric point (pH 4,5), heated with oven and sifted. Jack bean PRF powder hydrolysis at 55 °C used hydrolysis time and enzyme concentration according to treatment then continued with drying method using freeze drying. Jack Bean PRF hydrolysates conducted analysis include protein content, the degree of hydrolysis, protein molecular weight distribution, amino acid composition, and antioxidant activity using DPPH and reducing power methods.

The result has shown that the protein content of Jack Bean PRF hydrolysates had percent value about 39,067-70,436 %. The degree of hydrolysis had a value of about 9,034-30,421%. The molecular weight distribution using the highest proteolytic activity sample was at 3 hours and 3% of enzyme concentration had a value of about 18,07-127,35 kDa. Protein hydrolysates obtained from jack bean PRF had 15 kinds of amino acid and the highest amino acid is a glutamic acid which had the percent value 11,05%. Jack Bean PRF hydrolysate had percent value of inhibition (%RSA) respectively 7,932-14,690 %. The IC₅₀ value was about 3218,220 ppm which a concentration sample that could inhibit DPPH radical 50%. The reducing power value was 0,182-0,219.

PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan Laporan Kuliah Kerja yang berjudul “Aktivitas Antioksidan Hidrolisat Protein PRF (*Protein Rich Flour*) Koro Pedang (*Canavalia ensiformis* L.) Hasil Hidrolisis Menggunakan Protease Biduri (*Calotropis gigantea*)”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan S1 (Strata Satu) pada Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian. Dalam penyusunan skripsi ini penulis tidak lepas dari bantuan dan dukungan berbagai pihak. Oleh karena itu dalam kesempatan ini penulis menyampaikan ucapan terimakasih kepada :

1. ALLAH SWT yang selalu memberikan hidayah serta kesabaran dalam melaksanakan dan mendampingi penelitian serta dapat menyelesaikan Karya Tulis ini dengan sempurna;
2. Dr. Siswoyo Soekarno, S.TP., M.Eng. selaku dekan Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember;
3. Prof. Dr. Yuli Witono, STP., MP selaku Dosen Pembimbing akademik sekaligus Dosen Pembimbing Utama, yang telah meluangkan waktu dan pikiran dengan kesabaran guna memberikan bimbingan dan pengarahan selama proses penelitian hingga penulisan skripsi
4. Bapak Ahmad Nafi' S.TP., M.P., selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu dan pikiran dengan sabar dan tulus guna memberikan pengarahan dan bimbingan demi selesainya penelitian dan penulisan skripsi ini;
5. Selaku tim penguji yang telah memberikan saran dan evaluasi demi perbaikan skripsi ini;
6. Seluruh karyawan teknisi mbak ketut, mbak wim, mbak neni dan bapak mistar di Laboratorium Kimia dan Biokimia, Laboratorim Analisa Terpadu dan laboratorim Rekayasa Proses Pengolahan Hasil Pertanian di Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember;

7. Sahabat seperjuangan Reni Soraya, Isnitzia Bellia Indiana dan Loeffi Candra Devi yang selalu menghibur disaat susah dan senang serta memberikan semangat dalam menimba ilmu di kampus perkuliahan tercinta FTP Jaya.;
8. Teman-teman KKN 55 SUGUD yang selalu menyemangati dalam menjalani penelitian saya dari awal hingga akhir penelitian;
9. Teman hidup dan teman bisnis saya Mevillia Rizky Dayinta yang selalu mendukung saya untuk melanjutkan belajar dan belajar serta melanjutkan untuk kuliah S2 baik dalam negeri maupun luar negeri;
10. Orang tua saya yang selalu membanggakan saya dan selalu memberi arahan dalam mengerjakan sesuatu serta semangat yang memberikan saya motivasi untuk lebih percaya diri dalam menuntut ilmu.
11. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu, yang telah membantu penyusunan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan skripsi ini masih sangat banyak kekurangan dan sangat mengharap saran dan kritik yang bersifat memotivasi dari seluruh pihak. Semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi penulis dan dapat menambah wawasan serta bermanfaat untuk pembaca pada umumnya.

Jember, 05 Agustus 2018

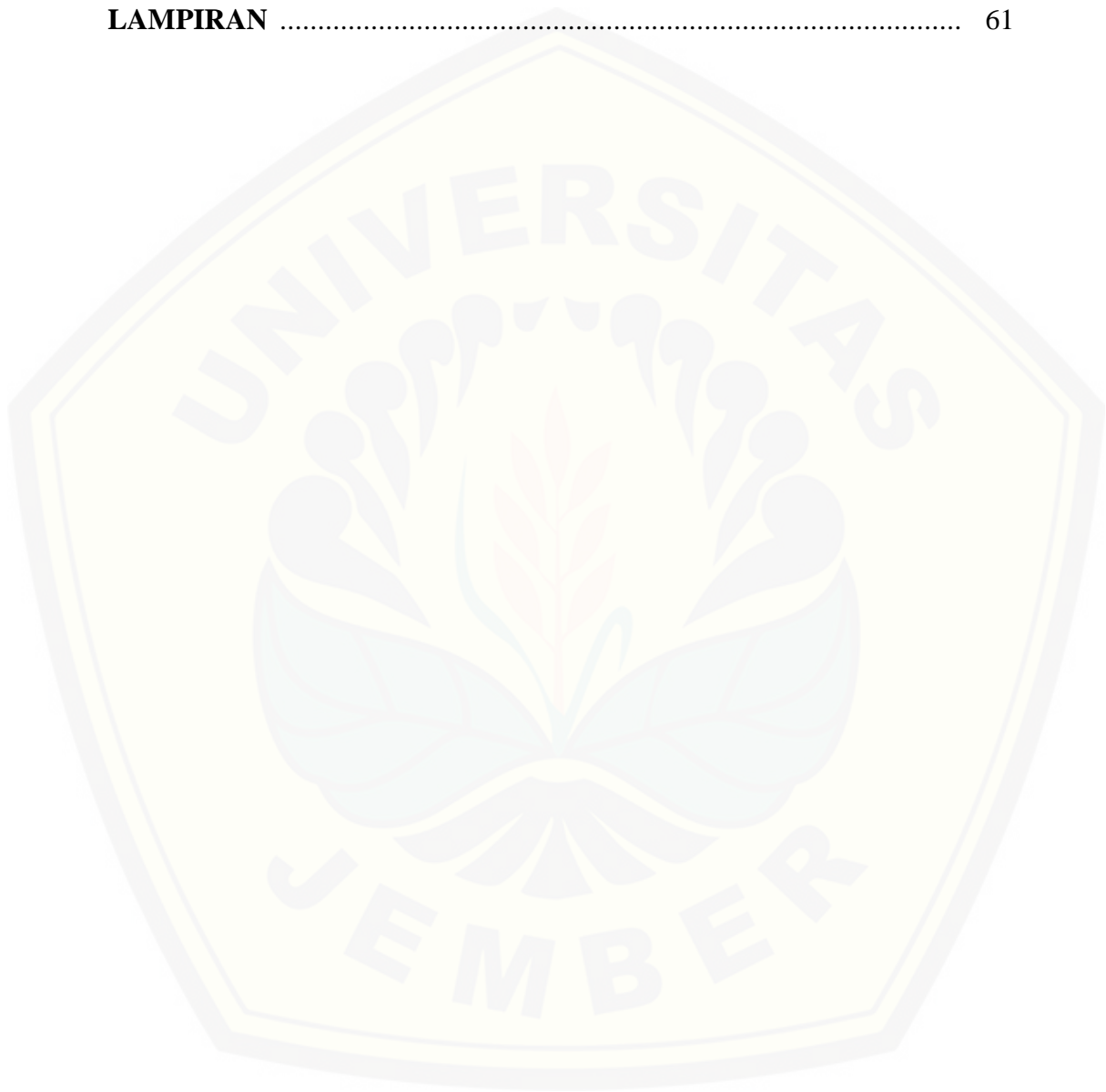
Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
SUMMARY	ix
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	2
1.3 Tujuan	3
1.4 Manfaat	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Karakteristik Koro Pedang	4
2.2 Sifat Kimia dan Nutrisional PRF Koro Pedang	6
2.3 Enzim Protease Biduri	9
2.4 Faktor-faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim	11
2.5 Penentuan Aktivitas Antioksidan	14
2.6 Reaksi Hidrolisis Protein Secara Enzimatis	17
2.7 Peptida yang Bersifat Antioksidan	19

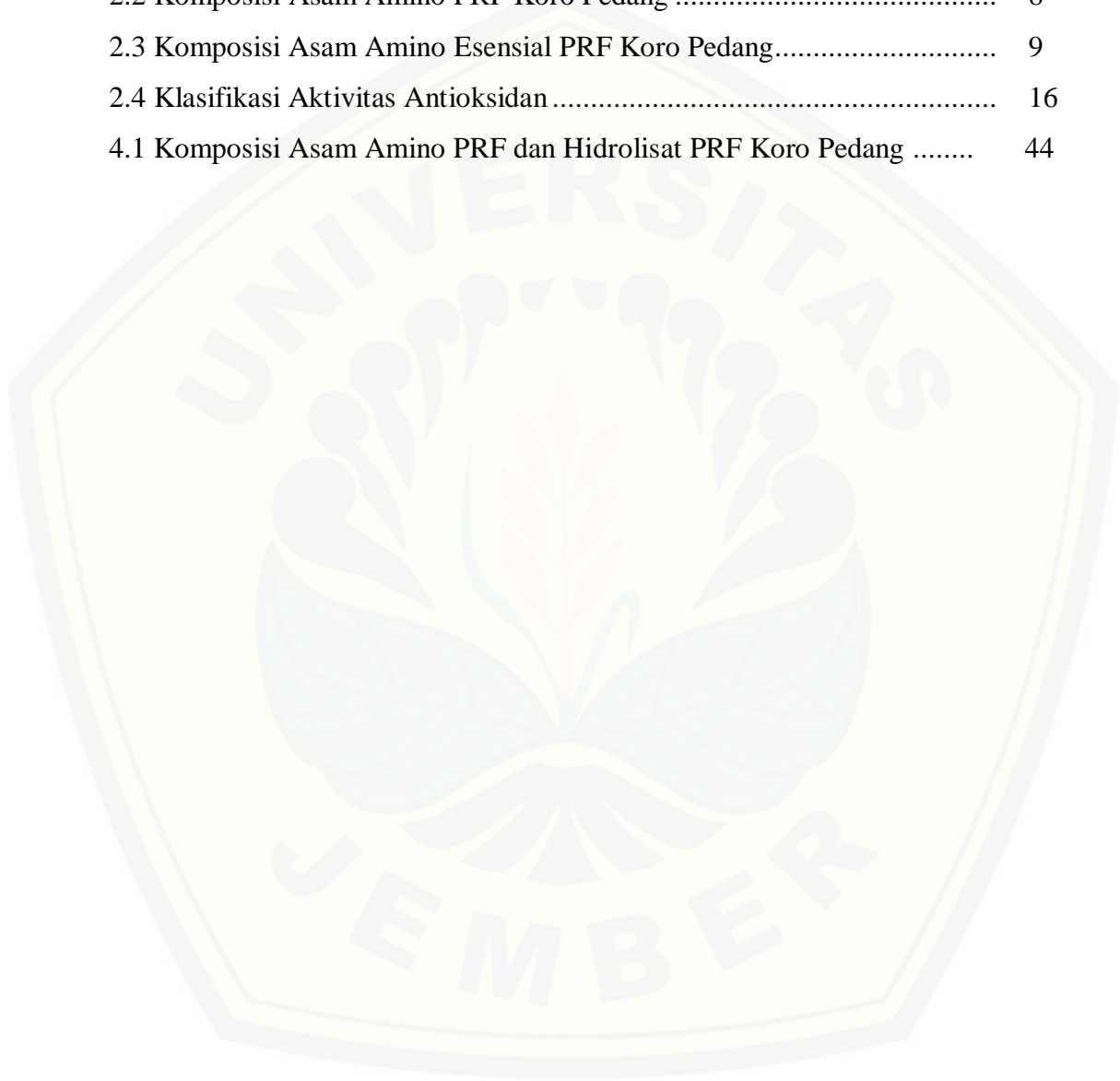
BAB 3. METODE PENELITIAN	22
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	22
3.2 Bahan dan Alat Penelitian.....	22
3.2.1 Bahan.....	22
3.2.2 Alat	22
3.3 Rancangan Percobaan	23
3.4 Pelaksanaan Penelitian.....	23
3.4.1 Produksi Protein Rich Flour Koro Pedang	24
3.4.2 Pembuatan Hidrolisat PRF Koro Pedang	25
3.5 Parameter Pengamatan	28
3.6 Prosedur Analisis	28
3.6.1 Kadar Protein	28
3.6.2 Derajat Hidrolisis	29
3.6.3 Distribusi Berat Molekul	29
3.6.4 Komposisi Asam Amino	31
3.6.5 Aktivitas Antioksidan	32
a. DPPH	32
b. Nilai IC ₅₀	33
c. <i>Reducing Power</i>	34
3.9 Analisa Data	35
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	36
4.1 Kadar protein	36
4.2 Derajat Hidrolisis	38
4.3 Distribusi Berat Molekul	41
4.4 Komposisi Asam Amino.....	43
4.5 Aktivitas Antioksidan	45
4.5.1 Aktivitas Antioksidan Metode DPPH.....	45
4.5.2 Nilai IC ₅₀	48
4.5.3 <i>Reducing Power</i>	49

BAB 5. PENUTUP	52
5.1 Kesimpulan	52
5.2 Saran	52
DAFTAR PUSTAKA	53
LAMPIRAN	61



DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Komposisi Kimia PRF Koro Pedang	7
2.2 Komposisi Asam Amino PRF Koro Pedang	8
2.3 Komposisi Asam Amino Esensial PRF Koro Pedang.....	9
2.4 Klasifikasi Aktivitas Antioksidan	16
4.1 Komposisi Asam Amino PRF dan Hidrolisat PRF Koro Pedang	44



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Tanaman Koro Pedang	5
2.2 Tanaman Biduri	9
2.3 Reaksi Radikal DPPH dengan Antioksidan.	16
2.4 Reaksi Perubahan Ferisianida menjadi Ferocianida	17
2.5 Reaksi Hidrolisis Secara Enzimatis	19
3.1 Produksi PRF Koro Pedang.....	24
3.2 Produksi Hidrolisat Kering	27
4.1 Kadar Protein Hidrolisat PRF Koro Pedang	36
4.2 Derajat Hidrolisis	38
4.3 Pita Protein Hasil Elektroforesis SDS-PAGE Hidrolisat PRF Koro Pedang	41
4.4 Aktivitas Antioksidan Hidrolisat PRF Koro Pedang	46
4.5 Persen Penghambatan Antioksidan BHT dan Hidrolisat PRF Koro Pedang	48
4.6 Nilai <i>Reducing Power</i>	50

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
A. Data Hasil Analisis	
A.1 Kadar Protein Hidrolisat PRF Koro pedang	61
A.2 Derajat Hidrolisis Hidrolisat PRF Koro Pedang	62
A.3 Berat Molekul Hidrolisat PRF Koro Pedang	64
A.4 Komposisi Asam Amino Hidrolisat PRF Koro Pedang	68
A.5 Aktivitas Antioksidan Metode DPPH	68
A.6 Nilai IC ₅₀ Hidrolisat PRF Koro Pedang	70
A.7 Aktivitas Antioksidan Metode <i>Reducing Power</i>	72
B. Pembuatan Bahan Kimia	
B.1 Bahan kimia pada analisis derajat hidrolisis dan kadar protein	75
B.2 Bahan kimia pada analisis berat molekul protein SDS-PAGE	75
B.3 Bahan kimia pada komposisi asam amino menggunakan HPLC..	77
B.4 Bahan kimia pada analisis aktivitas antioksidan metode DPPH...	78
B.5 Bahan kimia uji aktivitas antioksidan metode <i>reducing power</i>	79
C. Dokumentasi	
C.1 Tahap produksi hidrolisat PRF Koro Pedang.....	81
C.2 Tahap Analisis Hidrolisat PRF Koro Pedang	82

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Antioksidan adalah senyawa yang dalam jumlah kecil mampu menunda atau menjaga terjadinya oksidasi pada tubuh. Beberapa jenis senyawa antioksidan sintetik banyak digunakan pada industri pangan adalah *butylated hydro-xyanisole* (BHA), *butylated hydroxytoluene* (BHT), *propyl gallate* (PG) dan *tert-butyl hydroquinone* (TBHQ). Antioksidan sintetik dibatasi dalam pemakaiannya karena bersifat toksik dalam penggunaan jangka panjang. Alasan ini mendorong alternatif penggunaan senyawa antioksidan alami yang lebih aman jika masuk ke dalam tubuh. Berbagai jenis senyawa antioksidan alami telah banyak diidentifikasi selain dari hewan, mikroba serta tanaman juga berpotensi akan tingginya kadar senyawa antioksidan yang bermanfaat bagi tubuh.

Salah satu tanaman yang mempunyai potensi untuk diteliti senyawa antioksidannya adalah koro pedang. Koro pedang memiliki kandungan karbohidrat 60,11%, serat 8,3% dan protein 30,36% (Sudiono, 2010). Kandungan protein yang cukup tinggi pada koro pedang menjadikannya potensi untuk dimanfaatkan sebagai bahan dasar pembuatan *Protein Rich Flour* (PRF) atau tepung kaya protein. Menurut Windrati *et al.*, (2010) pada prinsipnya pembuatan PRF yaitu dengan cara menurunkan pH hingga titik isoelektrik (pH 4,5) sehingga proteinnya mengendap. Alternatif dalam mengolah *Protein Rich Flour* koro pedang dapat memberikan nilai tambah melalui hidrolisis protein secara enzimatis.

Hidrolisat protein menunjukkan potensi sebagai antioksidan melalui kemampuannya dalam merangkap radikal bebas (*free radical scavenging*), donor proton dan pengikat ion logam (Samaranayaka dan Li-Chan, 2011). Hidrolisis secara enzimatis berbagai sumber protein tanaman telah banyak diteliti seperti protein tepung wijen *defatted* (Liu *et al.*, 2008), protein kedelai (Chen *et al.*, 1995) dan protein gandum (Zhu *et al.*, 2006) yang menghasilkan hidrolisat protein dengan kemampuan antioksidan. Hidrolisis secara enzimatis merupakan pilihan metode paling aman dan lebih menguntungkan dibanding metode kimiawi, karena

metode ini menghasilkan asam-asam amino bebas dan peptida dengan rantai pendek yang bervariasi.

Enzim protease dari tanaman biduri (*Calotropis gigantea*) merupakan enzim yang mengkatalisa reaksi pemecahan rantai polipeptida pada protein dengan cara menghidrolisa ikatan peptidanya menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana seperti peptida dan asam amino. Penelitian Witono *et al.*, 2013 menyatakan enzim protease biduri telah banyak digunakan untuk hidrolisat ikan, pembuatan *flavor enhancer*, pengempukan daging, penggumpalan keju dan ekstraksi VCO. Masih terbatasnya informasi dan pemanfaatan PRF koro pedang sebagai sumber antioksidan alami, mendorong dilakukannya penelitian ini bertujuan untuk melihat pengaruh konsentrasi enzim dan lama hidrolisis terhadap aktivitas antioksidan dari hidrolisat PRF yang dihidrolisis menggunakan protease biduri. Pengaruh tersebut meliputi kadar protein, derajat hidrolisis, berat molekul, komposisi asam amino, aktivitas antioksidan yang terdiri dari *Radical Scavenging Activity*, IC_{50} dan *Reducing Power*.

1.2 Perumusan Masalah

Antioksidan berperan penting dalam kesehatan dan merupakan senyawa atau molekul yang dapat menghambat terjadinya oksidasi pada sel dan menyebabkan penyakit-penyakit degeneratif tertentu. Salah satu produk yang mempunyai potensi untuk diteliti senyawa antioksidannya adalah *Protein Rich Flour* koro pedang. Tingginya kadar protein pada PRF koro pedang mengindikasikan adanya peptida bioaktif yang masih terikat bersama protein alaminya. Peptida bioaktif berpotensi antioksidan dapat dihasilkan dengan perlakuan hidrolisis secara enzimatik salah satunya dengan enzim protease biduri untuk memecah asam-asam amino menjadi fraksi yang lebih rendah dan mudah dicerna oleh tubuh. Proses hidrolisis menggunakan protease biduri ini diharapkan mampu untuk mengetahui pengaruh konsentrasi enzim dan lama hidrolisis terhadap kadar protein, derajat hidrolisis, berat molekul, komposisi asam amino dan aktivitas antioksidan PRF.

1.3 Tujuan

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Mengetahui pengaruh konsentrasi enzim biduri dan lama hidrolisis terhadap karakteristik kimia hidrolisat *protein rich flour* koro pedang.
2. Mengetahui aktivitas antioksidan hidrolisat PRF (*protein rich flour*) koro pedang.

1.4 Manfaat

Adapun manfaat yang diharapkan dari penelitian ini adalah:

1. Membuka peluang baru untuk memanfaatkan koro pedang sebagai bahan baku produk *Protein Rich Flour* (PRF).
2. Menambah nilai guna PRF (*Protein Rich Flour*) sebagai produk dengan peptida bioaktif yang bersifat antioksidan.
3. Menambah sumber antioksidan alami bagi industri pangan.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Karakteristik Koro Pedang

Koro merupakan salah satu jenis kacang-kacangan yang dapat tumbuh di tanah yang kurang subur dan kering. Selain untuk dimanfaatkan bijinya, tujuan penanaman koro adalah sebagai tanaman pelindung dan pupuk hijau (Kanetro dan Hastuti, 2003). Tanaman koro pedang bentuknya menyerupai perdu dan batangnya bercabang pendek dan lebat dengan jarak percabangan pendek dan perakaran termasuk akar tanggung. Tanaman koro pedang dapat tumbuh sampai ketinggian 2000 mdpl, tumbuh baik pada suhu rata-rata 14 °C-27 °C dilahan tadah hujan atau 12°C-32 °C di daerah tropis dataran rendah. Biji koro pedang lonjong menjorong dan lembaga berwarna hitam. Delatorre (2008), melaporkan selain mengandung α -aminobutyric acid (Abu), kacang koro pedang juga mengandung lectin, yaitu karbohidrat sederhana yang berikatan dengan protein. Akan tetapi koro juga mengandung beberapa senyawa merugikan yaitu glukosianida yang bersifat toksik dan asam fitat yang merupakan senyawa antigizi.

Menurut Kanetro dan Hastuti (2006), senyawa antinutrisi yang sering terdapat pada kacang-kacangan antara lain enzim lipoksigenase, tripsin inhibitor, asam fitat, oligosakarida, senyawa glikosida dan sianida. Sebaliknya, ternyata selain bersifat sebagai senyawa antinutrisi, fitat memiliki peranan dalam kesehatan yang dianggap positif yaitu sebagai antioksidan yang dapat menangkal adanya radikal bebas maupun senyawa non radikal yang dapat menimbulkan oksidasi pada biomolekul seperti protein, karbohidrat, lipida, dan lain-lain. Ekanayake (2006), menuliskan kacang koro pedang memiliki kandungan *canavanine* yang sangat tinggi sekitar 88–91%. Menurut Campbell (2004), *canavanine* merupakan suatu senyawa asam amino yang mirip Arginin. Apabila dikonsumsi senyawa ini akan bergabung ke dalam protein yang biasa ditempati oleh arginin. *Canavanine* sangat berbeda dengan arginin, sehingga dapat mengganggu fungsi protein tersebut. Kandungan *Canavanine* ini dapat dihilangkan dengan cara di rendam, dan dihancurkan atau di giling (Ekanayake,

2006). Pada gambar berikut ini ditampilkan beberapa gambar tanaman koro pedang dan biji koro pedang dapat dilihat pada Gambar 2.1



Gambar 2.1 Tanaman dan biji Koro Pedang (*Canavalia ensiformis* (L.) DC).
Sumber : Deptan, 2013

Kandungan gizi koro hampir sama dengan kedelai yaitu karbohidrat dan protein yang cukup tinggi serta kandungan lemak yang rendah. Menurut Gustiningsi dan Dian (2011) koro pedang mengandung protein 27,4% sedangkan kedelai 39%, kandungan karbohidratnya sebesar 63,5% sementara kedelai hanya 35,5%. Koro - koroan mempunyai sumber vitamin B1, beberapa mineral dan serat pangan bagi kesehatan (Windrati *et al.*, 2010). Kacang koro pedang sangat potensial untuk dimanfaatkan karena memiliki keseimbangan asam amino yang baik dan bioavailabilitasnya tinggi (Gustiningsih *et al.* 2011) walaupun memiliki kandungan protein dan lemak yang lebih rendah daripada kacang kedelai. Asam amino esensial dalam koro pedang (isoleusin, leusin, histidin, valin, dan treonin) lebih tinggi dari referensi *Food Agricultural Organization* (FAO) apabila dibandingkan dengan kacang-kacangan lainnya (*V. mungo* dan *V. radiata*, *C. arietinum* dan *C. cajan*) (Metsagang *et al.* 2013).

Biji koro pedang belum dimanfaatkan secara optimum di Indonesia. Hal ini karena adanya zat antinutrisi pada kacang koro pedang seperti hemaglutinin (*concanavalin A*) dan glikosida sianogenik (Kay, 1979). Aktivitas hemaglutinasi protein *concanavalin A* dapat dihilangkan secara sempurna melalui perendaman yang diikuti dengan pemanasan tinggi maupun fermentasi (Purwani, 2014). Glikosida sianogenik adalah senyawa toksik yang dapat diuraikan menjadi asam

sianida (HCN) oleh enzim glukosidase di dalam tubuh. Akumulasi HCN pada tubuh dapat menghambat penyerapan protein. Asam sianida (HCN) merupakan komponen yang larut air sehingga dapat dihilangkan dengan perendaman pemanasan, fermentasi serta sebagai pengolahan lainnya (Soetan dan Oyewole, 2009). Menurut Sukrosono (2006) perendaman kacang koro pedang ke dalam larutan kalsium dapat menurunkan kadar HCN pada kacang koro pedang karena garam kalsium dapat berikatan dengan HCN.

2.2 Sifat Kimia dan Nutrisional *Protein Rich Flour* (PRF) Koro Pedang

Kandungan protein yang tinggi pada koro-koroan memiliki potensi sebagai bahan baku produk PRF (*Protein Rich Flour*). Karbohidrat yang dimanfaatkan adalah pati, yang dapat diekstraksi dengan menggunakan ekstraksi air. Secara umum adanya senyawa anti gizi pada koro-koroan akan menimbulkan cita rasa yang kurang disukai serta mengurangi bioavailabilitas nutrisi dalam tubuh. Senyawa anti gizi tersebut meliputi tripsin inhibitor, hemaglutinin, polifenol (tanin) dan asam fitat. Koro-koroan juga mengandung senyawa racun yaitu sianida. Sebelum dikonsumsi diperlukan beberapa perlakuan pendahuluan untuk menghilangkan atau mengurangi kandungan senyawa anti gizi dan senyawa racun tersebut. Koro direndam selama 48-72 jam tergantung dari jenis koronya dan air rendaman diganti setiap 6 jam. Sianida bersifat larut dalam air, karena itu dengan perendaman dan pembilasan beberapa kali sudah mampu mengurangi sianida yang ada pada koro. Koro mengandung enzim β -glukosidase yang mampu merusak kompleks sianida sehingga sianida terlarut.

Proses pembuatan *Protein Rich Flour* koro pedang, pada perendaman 48-72 jam maka air akan masuk dalam biji, sehingga biji menjadi lunak. Proses selanjutnya yaitu penggilingan dengan menggunakan air sehingga diperoleh susu koro (Windrati *et al.*, 2001). Endapan protein-pati dihasilkan dengan penurunan pH menggunakan HCl sampai titik isoelektrik (pH 4,5). Menurut Subagio *et al.*, 2002, dengan teknik produksi tersebut rendemen protein-pati yang didapatkan pada koro pedang adalah sebesar 30,5%. Jika rendemen ini dikeringkan akan dihasilkan PRF. Pengolahan bahan pangan dengan panas dan pengaturan pH dapat

menginaktivasi antitripsin karena antitripsin peka terhadap panas dan pH tinggi. Inaktivasi penghambat tripsin bisa menggunakan panas atau perebusan serta dengan menaikkan pH.

Pengolahan yang tepat menggunakan panas dan pengaturan pH, antitripsin dapat diinaktivasikan. Hal ini dapat berpengaruh baik terhadap kesehatan, sebagaimana diketahui, adanya antitripsin dapat membengkakkan pankreas dan menghambat pertumbuhan. Antitripsin pada PRF koro pedang menurut penelitian Windrati *et al.*, (2010) dihasilkan $8,90 \pm 2,30$ unit/gram. Senyawa antitripsin pada PRF koro pedang tergolong rendah sehingga produk PRF ini memiliki daya cerna terhadap protein yang tinggi. PRF koro pedang selain mempunyai senyawa antitripsin yang rendah juga tinggi akan kandungan karbohidrat dan protein serta terdiri dari beberapa komposisi kimia lainnya. Komposisi kimia PRF dari koro pedang dapat dilihat pada Tabel 2.1

Tabel 2.1 Komposisi kimia *Protein Rich Flour* (PRF) Koro Pedang

Komponen	Nilai (%)
Air	$10,09 \pm 0,02$
Protein	$37,61 \pm 0,04$
Lemak	$4,49 \pm 0,04$
Abu	$3,04 \pm 0,004$
Pati	$36,70 \pm 0,57$
Total gula	$0,57 \pm 0,23$
Serat	$2,23 \pm 0,06$

Sumber : Windrati., *et al* (2010)

Menurut Subagio (2003) kandungan protein PRF koro pedang sebesar 37,61% sedangkan kandungan protein biji koro pedang sebesar 21,7%. Tingginya kandungan protein PRF koro pedang tersebut disebabkan karena PRF adalah produk hasil ekstraksi dimana pada saat proses pembuatan PRF dengan cara menurunkan pH sampai titik isoelektrik (pH 4,5) sehingga proteinnya mengendap. Karakteristik koro pedang selain dilihat pada kandungan protein, air, karbohidrat, abu namun dapat dilihat dari komposisi asam amino yang tersusun dalam PRF koro pedang. Sifat nutrisi PRF koro pedang dapat dijabarkan dalam komposisi asam amino koro pedang pada Tabel 2.2.

Tabel 2.2 Komposisi asam amino *Protein Rich Flour* (PRF) Koro Pedang

Asam amino	Nilai (%)
Asam aspartat	4,51
Asam glutamat	5,47
Serin	1,78
Histidin	1,09
Glisin	1,81
Treonin	1,56
Arginin	2,33
Alanin	1,70
Tirosin	1,09
Metionin	0,32
Valin	2,09
Fenilalanin	1,98
Isoleusin	2,08
Leusin	3,68
Lisin	2,30

Sumber : Windrati., *et al* (2010)

Protein tersusun dari berbagai asam amino yang masing-masing dihubungkan dengan ikatan peptida. Pembentukan awal protein hanya tersusun dari 20 asam amino yang dikenal sebagai asam amino dasar atau asam amino penyusun protein (proteinogenik). Mutu protein dinilai dari perbandingan asam-asam amino yang terkandung dalam protein tersebut. Asam-asam amino yang biasanya sangat kurang dalam bahan makanan disebut dengan asam amino pembatas. Komponen asam amino yang mempunyai nilai terbesar pada PRF koro pedang adalah asam glutamat sedangkan komponen asam amino yang mempunyai nilai terkecil adalah metionin. Asam amino esensial atau asam amino yang tidak dapat diproduksi sendiri oleh tubuh dapat diperoleh dari sumber makanan, berikut merupakan asam amino esensial pada PRF koro pedang dapat dilihat pada Tabel 2.3.

Tabel 2.3 Komposisi Asam Amino Esensial PRF Koro Pedang

Asam Amino Esensial	mg/g protein PRF Koro Pedang
Treonin	41,48
Isoleusin	55,30
Leusin	97,85
Lisin	61,15
Metionin + sistein	8,51
Fenilalanin + Tirosin	81,63
Valin	55,67
Histidin	28,98

Sumber : Windrati., *et al* (2010)

Asam amino esensial yang mempunyai nilai terendah adalah metionin dan sistein yaitu sebesar 8,51 mg/g protein PRF koro pedang. Asam amino yang mempunyai nilai yang paling rendah tersebut merupakan asam amino pembatas pada PRF koro pedang. Seperti yang disebutkan oleh Tejasari (2005) bahwa asam amino pembatas pada biji-bijian, jenis kacang dan sayur-sayuran adalah metionin dan sistein.

2.3 Enzim Protease Biduri

Tanaman biduri merupakan tumbuhan yang umum dijumpai di Indonesia, Malaysia, Filipina, Thailand, Sri Lanka, India dan China. Tanaman ini merupakan semak tegak dengan tinggi 0,5-3 m. Biduri banyak ditemukan di daerah bermusim kemarau panjang, seperti padang rumput yang kering, lereng-lereng gunung yang rendah dan pantai berpasir (Dalimartha, 2003). Gambar tanaman biduri dapat dilihat pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2 Tanaman Biduri

Tanaman biduri dapat digunakan sebagai sumber enzim protease. Enzim biduri tergolong eksopeptidase (Witono, 2009). Ekstrak kasar protease biduri

mempunyai kemampuan untuk mengempukkan daging (Witono *et al.*, 2002) dan menggumpalkan susu sebagai rendemen keju (Witono *et al.*, 2003). Pemakaian enzim protease dinilai lebih efektif karena memiliki beberapa keuntungan yaitu proses lebih efisien, mengurangi material kasar, meningkatkan kualitas produk, pengganti *food additive* dan menghindari kemungkinan berbahaya dari makanan (Rastall, 2007). Enzim protease biduri dapat diperoleh dari getah tanaman biduri (*Calotropis gigantea*). Ekstrak dari tanaman biduri baik getah, batang maupun daun sangat potensial sebagai sumber enzim protease (Witono, 2002a; dan Witono, 2002b). Menurut Dalimartha (2003) kandungan kimia yang terdapat dalam tanaman biduri, yaitu :

- a. Akar mengandung saponin, saponin, kalotropin, kalotoksin, uskarin, kalaktin, gigatin dan harsa,
- b. Daun mengandung saponin, flavonoid, polifenol, tanin dan kalsium oksalat,
- c. Batang mengandung tanin, saponin dan kalsium oksalat,
- d. Getah mengandung racun jantung yang menyerupai digitalis.

Berdasarkan letak pemecahannya enzim protease dapat digolongkan menjadi 2 macam yaitu eksopeptidase dan endopeptidase. Eksopeptidase digunakan untuk enzim yang memecah ikatan peptida secara acak dari salah satu ujung protein asam amino terminal dengan cara menghidrolisis ikatan peptidanya. Pada tingkat lanjut, enzim ini dapat menghasilkan sejumlah asam amino. Protease eksopeptidase ada dua macam yaitu karboksi eksopeptidase (memecah protein dari ujung karboksil) dan amino eksopeptidase (memecah protein dari ujung amina). Endopeptidase adalah enzim yang memecah ikatan peptida secara acak pada bagian tengah (dalam) rantai molekul protein dan menghasilkan unit-unit asam amino. Oleh karena itu kebanyakan endopeptidase hanya akan menghasilkan asam amino dalam jumlah terbatas (Witono, 2009). Hasil penelitian Witono *et al.* (2007 a), menyebutkan bahwa enzim protease biduri memiliki karakteristik sebagai berikut:

1. Suhu optimum aktivitas enzim biduri berkisar pada 55°C;
2. Aktivitas optimum enzim protease biduri berkisar pada pH 7;

3. Enzim biduri memiliki daya tahan terhadap panas (termostabilitas) yang cukup tinggi dan terdenaturasi dengan cepat pada suhu 90 °C;
4. V_{\max} protease biduri pada substrat kasein adalah 18,87 mg/ml/min.
5. Berat molekul enzim biduri adalah sekitar 25,18 kDa.

2.4 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim

Penentuan karakter dan sifat enzim maka akan mempermudah penggunaan enzim dalam bentuk aplikasi produk tertentu. Penentuan karakter enzim berhubungan erat dengan berbagai faktor yang dapat mempengaruhi aktivitas enzim tersebut. Berikut merupakan faktor-faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim antara lain:

2.4.1 Suhu

Pada umumnya semakin tinggi suhu, maka semakin meningkat pula laju reaksi kimia baik pada substrat yang dikatalisis maupun yang tidak dikatalisis oleh enzim. Perlu diingat bahwa enzim adalah protein, jadi semakin tinggi suhu proses maka inaktivasi enzim juga meningkat. Hal tersebut dikarenakan terjadinya denaturasi pada protein enzim sehingga aktivitas enzim akan menurun (Holme dan Peck, 1998). Wong (1995) menyatakan bahwa pengaruh suhu terhadap enzim agak kompleks, misalnya pada suhu yang terlalu tinggi dapat mempercepat perusakan atau pemecahan enzim, sebaliknya semakin tinggi suhu (dalam batas tertentu) maka akan semakin aktif enzim tersebut. Bila suhu masih naik terus, laju kerusakan enzim akan melampaui reaksi katalisis enzim.

Whitaker (1994) juga menyatakan, meskipun kenaikan suhu akan meningkatkan kecepatan reaksi yang dikatalisis enzim, namun kenyataan ini hanya berlaku dalam kisaran suhu yang terbatas dengan tegas. Kecepatan reaksi mula-mula meningkat dengan kenaikan suhu dan peningkatan energi kinetik pada molekul-molekul yang bereaksi. Tetapi pada akhirnya energi kinetik enzim akan melampaui rintangan energi untuk memutuskan ikatan hidrogen dan hidrofobik yang lemah, yang mempertahankan struktur skunder-tersiernya. Perubahan-perubahan temperatur dapat mempengaruhi reaksi enzimatik dari beberapa segi, yaitu kestabilan enzim, perubahan daya kelarutan gas, perubahan pH buffer,

afinitas enzim terhadap aktivator dan inhibitor, daya reaksi kompetisi, ionisasi gugus fungsi, afinitas enzim-substrat, velositas konversi dari substrat ke produk, dan derajat asosiasi multipolipeptida dari enzim (Whitaker, 1994).

2.4.2 Termostabilitas

Perbedaan sumber enzim menyebabkan perbedaan daya tahan panas. Enzim yang serupa seperti amilase bila dihasilkan oleh bakteri, memiliki daya tahan yang lebih tinggi terhadap panas dibandingkan dengan enzim amilase yang berasal dari kapang. Umumnya, enzim-enzim bekerja sangat lambat pada suhu di bawah titik beku dan keaktifannya meningkat sampai 45°C. Hampir semua enzim mempunyai aktivitas optimal pada suhu 30°C sampai 40°C dan denaturasi mulai terjadi pada suhu 45°C. Hubungan antara suhu dan waktu bagi inaktivasi enzim secara total lebih menarik karena mempunyai nilai praktis yang penting. Penginaktivan enzim tertentu kadang-kadang berguna sebagai indikator untuk menilai seberapa jauh efektivitas proses inaktivasi enzim misalnya pasteurisasi dan sterilisasi dalam pengolahan bahan pangan (Wong, 1995).

2.4.3 pH

Faktor pH lingkungan berhubungan dengan kestabilan dan daya ionisasi gugus aktif suatu enzim akan mempengaruhi aktivitas enzim (Whitaker, 1994). Enzim memiliki kepekaan yang sangat tinggi terhadap perubahan pH di lingkungannya. Pada umumnya enzim bersifat amfolitik, yang berarti enzim mempunyai konstanta disosiasi pada gugus asam maupun gugus basanya, terutama pada gugus residu terminal karboksil dan gugus terminal aminonya. Enzim menunjukkan aktivitas maksimum pada suatu kisaran pH disebut dengan pH optimum, yang umumnya antara pH 4,5 sampai 8,0. Suatu enzim tertentu mempunyai kisaran pH optimum yang sangat sempit. Di sekitar pH optimum enzim mempunyai stabilitas yang tinggi.

Pengendalian pH sehingga mempengaruhi aktivitas enzim sangat diperlukan dalam praktek teknologi pangan. Penggunaan enzim dalam industri pangan memiliki peranan yang penting, pengaturan pH harus ditujukan untuk mendapatkan keaktifan enzim yang maksimal (Wong, 1995). Menurut Holme dan Peck (1998), pada kisaran pH yang ekstrem baik asam maupun basa terjadi

inaktivasi enzim yang bersifat *irreversible*. Pada kisaran pH selebihnya masih dapat terjadi inaktivasi, tetapi bersifat *reversible*. Enzim dapat pula mengalami konformasi bila pH bervariasi. Gugus muatan yang jauh dari daerah terikatnya substrat mungkin diperlukan untuk mempertahankan struktur tersier atau kuartener yang aktif. Dengan berubahnya muatan pada gugus ini, protein dapat terbuka menjadi lebih kompleks atau berdisosiasi menjadi protomer, semua ini mengakibatkan kehilangan aktivitas. Bergantung pada besarnya perubahan, aktivitas bisa pulih atau tidak ketika enzim tersebut dikembalikan kepada pH-nya yang optimal (Whitaker, 1994).

2.4.4 Konsentrasi Enzim dan Substrat

Enzim merupakan reaktan yang bergabung dengan substrat untuk membentuk kompleks enzim substrat, (EnzS), yang terurai dan membentuk produk P serta enzim bebas. Kecepatan awal suatu reaksi merupakan kecepatan yang diukur sebelum terbentuk produk yang cukup untuk memungkinkan terjadinya reaksi balik. Kecepatan awal suatu reaksi yang dikatalisis enzim selalu sebanding dengan konsentrasi enzim (Harper, 1999). Jika konsentrasi substrat meningkat sementara semua kondisi lainnya dipertahankan tetap tidak berubah (konstan), percepatan awal yang terukur, maka nilai kecepatan yang diukur kalau substrat yang sudah bereaksi jumlahnya sedikit sekali akan meningkat hingga mencapai nilai maksimum, kecepatan maksimum dan tidak berlanjut. Percepatan reaksi meningkat dengan meningkatnya konsentrasi substrat hingga mencapai suatu keadaan dimana enzim tersebut dikatakan sudah jenuh oleh substrat. Pada batas konsentrasi tertentu tidak terjadi kenaikan kecepatan reaksi walaupun konsentrasi substrat diperbesar (Anna, 2009).

2.4.5 Kinetika Enzim

Enzim merupakan reaktan yang bergabung dengan substrat untuk membentuk kompleks enzim substrat, (EnzS), yang terurai dan membentuk produk P serta enzim bebas. Kecepatan awal suatu reaksi merupakan kecepatan yang diukur sebelum terbentuk produk yang cukup untuk memungkinkan terjadinya reaksi balik. Kecepatan awal suatu reaksi yang dikatalisis enzim selalu sebanding dengan konsentrasi enzim (Wong, 1995). Jika konsentrasi substrat

meningkat sementara semua kondisi lainnya dipertahankan tetap tidak berubah (konstan), maka nilai kecepatan yang diukur kalau substrat yang sudah bereaksi jumlahnya sedikit sekali akan meningkat hingga mencapai nilai maksimum, kecepatan maksimum dan tidak berlanjut. Kecepatan reaksi meningkat dengan meningkatnya konsentrasi substrat hingga mencapai suatu keadaan dimana enzim tersebut sudah jenuh oleh substrat (Holme dan Peck, 1998).

2.4.6 Inhibitor Protease

Inhibitor enzim merupakan suatu komponen yang dapat menurunkan laju rata-rata pengukuran reaksi katalitik enzim (Carreno dan Cortes, 2000). Inhibitor protein alami lebih dari 100 jenis telah berhasil diidentifikasi dan lebih banyak lagi jenis yang telah disintesis. Inhibitor proteinase memiliki berbagai macam bentuk dan sering dikelompokkan berdasarkan mekanisme reaksinya dan kesamaan teksturnya. Inhibitor enzim proteinase dibagi menjadi tiga kelas, pertama adalah inhibitor yang bereaksi dengan lebih dari satu kelas protein, kedua adalah inhibitor yang spesifik terhadap satu kelas proteinase dan ketiga adalah yang melibatkan selektifitas yang tinggi terhadap satu jenis proteinase (Wijaya 2005).

2.5 Penentuan Aktivitas antioksidan

Metode yang digunakan dalam pengukuran aktivitas antioksidan didasarkan pada kemampuan antioksidan dalam mencegah terjadinya proses oksidasi oleh adanya senyawa radikal dalam tubuh. Adapun beberapa metode yang digunakan dalam penentuan aktivitas antioksidan adalah metode DPPH dan *reducing power* yang dibedakan berdasarkan jenis radikal dan cara kerja senyawa antioksidan.

2.5.1 Metode DPPH (*2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl*)

Antioksidan didefinisikan sebagai senyawa yang menghambat oksidasi dengan cara bereaksi dengan radikal bebas reaktif membentuk radikal bebas tak reaktif yang stabil, atau bisa didefinisikan sebagai senyawa yang mampu menunda, memperlambat atau menghambat reaksi oksidasi pada tubuh atau stress oksidatif (Packer *et al.*, 1999). Stress oksidatif adalah suatu keadaan dimana

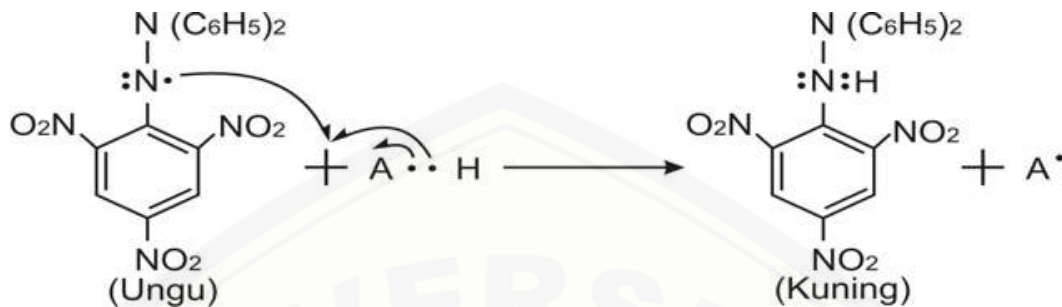
jumlah radikal bebas di dalam tubuh melebihi kapasitas tubuh untuk menetralsirnya dan mengakibatkan kelebihan radikal bebas yang akan bereaksi dengan lemak, protein, asam nukleat sehingga terjadi kerusakan pada jaringan tubuh. Kerusakan sel akibat radikal bebas tampaknya menjadi penyebab utama penuaan dini dan beberapa penyakit degeneratif seperti kanker, penyakit jantung, katarak, penurunan sistem kekebalan tubuh dan disfungsi otak. Radikal bebas adalah molekul yang kehilangan elektron, sehingga molekul tersebut menjadi tidak stabil dan selalu berusaha mengambil elektron dari molekul atom sel lain. Radikal bebas dapat dihasilkan dari hasil metabolisme tubuh dan faktor eksternal seperti asap rokok, hasil penyinaran UV, zat kimiawi dalam makanan, polusi, diet yang tidak sehat, stress dan lainnya. Pengujian dengan cara ini dilakukan dengan cara mengukur penangkapan radikal sintetik dalam pelarut organik polar seperti etanol pada suhu kamar.

Radikal sintetik yang digunakan adalah DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) dan ABTS (2,2-azinobis-3-etil benzothiazolin-asam sulfonat). Senyawa DPPH adalah radikal bebas yang stabil berwarna ungu. Ketika direduksi oleh radikal akan berwarna kuning (*diphenyl picrylhydrazin*). Metode DPPH berfungsi untuk mengukur elektron tunggal seperti aktivitas transfer H* dan juga untuk mengukur aktivitas penghambatan radikal bebas. Mekanisme penangkapan radikal DPPH oleh antioksidan yaitu berupa donasi proton kepada radikal (Pokorni, 2001). Donasi proton menyebabkan radikal DPPH berwarna ungu menjadi senyawa non-radikal yang akan kehilangan warna ungunya yang mana pemudaran warna ini dapat ditunjukkan dengan adanya penurunan serapan dari DPPH pada panjang gelombang optimumnya.

$$\% \text{ Aktivitas antioksidan} = 1 - \frac{\text{absorbansi blanko} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi blanko}} \times 100\%$$

Campuran reaksi berupa larutan sampel yang dilarutkan dalam etanol dan di inkubasikan pada suhu 37⁰C selama 30 menit, dibaca pada panjang gelombang 517 nm. Hasil perubahan warna dari ungu menjadi kuning stokiometrik dengan jumlah elektron yang ditangkap (Huang *et al.*, 2005; Moreno, 2002). Reaksi

antara radikal bebas DPPH dengan senyawa antioksidan menurut Yamaguchi *et al.*, (1998) dapat dilihat pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3 Reaksi antara radikal DPPH dengan senyawa antioksidan

Nilai %RSA (*Radical Scavenging Activity*) 0% berarti tidak mempunyai aktivitas antiradikal bebas atau antioksidan, sedangkan nilai %RSA 100% berarti peredaman total dan pengujian perlu dilanjutkan dengan pengenceran larutan uji untuk melihat batas konsentrasi aktivitasnya. Parameter yang dapat digunakan untuk menginterpretasi hasil uji DPPH dengan pengenceran larutan uji diantaranya adalah IC₅₀. Nilai IC₅₀ didefinisikan sebagai konsentrasi ekstrak yang dapat menyebabkan penurunan aktivitas DPPH sebanyak 50% yang dilihat dari pengurangan intensitas warna ungu (Molyneux, 2004). Semakin tinggi aktivitas antioksidan, maka nilai parameter IC₅₀ akan semakin kecil. Aktivitas antioksidan suatu senyawa dalam meredam radikal bebas tergantung pada rantai samping dan substitusi cincin aromatik yang dimiliki. Klasifikasi aktivitas antioksidan dalam meredam radikal bebas dapat dilihat pada Tabel 2.4.

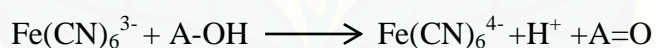
Tabel 2.4 Klasifikasi aktivitas antioksidan

Nilai IC ₅₀	Sifat Antioksidan
50 ppm < (0,05 mg/ml)	Sangat kuat
50 ppm-100 ppm (0,05-0,10 mg/ml)	Kuat
100 ppm-150 ppm (0,10-0,15 mg/ml)	Sedang
150 ppm-200 ppm (0,150-0,20 mg/ml)	Lemah

Sumber : Armala, (2009)

2.5.2 Metode *Reducing Power*

Metode *reducing power* ini didasarkan pada prinsip peningkatan absorbansi yang menunjukkan peningkatan aktivitas antioksidan. Metode *reducing power* merupakan metode yang digunakan untuk mengukur kekuatan reduksi suatu sampel. Metode ini dilakukan berdasarkan kemampuan suatu senyawa dalam mereduksi Fe^{3+} menjadi Fe^{2+} . Antioksidan dalam sampel akan mereduksi Fe^{3+} menjadi Fe^{2+} dengan memberikan sebuah elektron. Jumlah kompleks Fe^{2+} dapat diketahui dengan mengukur formasi *Perl's Prussian Blue* pada panjang gelombang 700 nm. Meningkatnya absorbansi pada 700 nm menjadi indikasi meningkatnya kemampuan mereduksi dari antioksidan (Ebrahimzadeh *et al.*, 2008). Reaksi perubahan warna yang terjadi pada metode ini karena adanya pembentukan kompleks warna kalium ferisianida, asam trikloroasetat dan besi (III) klorida yang dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 700 nm (Amelia, 2011). Antioksidan pada hidrolisat PRF koro pedang yang memiliki kemampuan mereduksi sehingga bereaksi dengan ferisianida $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ membentuk ferisianida $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. Proses transfer elektron menjadi aktif dengan medium berupa buffer fosfat (Barzegar, 2012). Reaksi yang terjadi dapat dilihat pada Gambar 2.4



Gambar 2.4 Reaksi perubahan Ferisianida membentuk Ferisianida

2.6 Reaksi Hidrolisis Protein secara Enzimatis

Hidrolisis protein adalah pecahnya atau terputusnya ikatan peptida dari protein menjadi molekul yang lebih sederhana. Hidrolisis ikatan peptida tersebut akan menyebabkan beberapa perubahan pada struktur protein, yaitu meningkatnya kelarutan dikarenakan bertambahnya kandungan NH_3^+ dan COO^- serta bekurangnya berat molekul protein atau polipeptida dan juga rusaknya struktur globular protein (Winarno, 2002). Menurut Winarno (2002), ketika protein dihidrolisis maka akan terjadi perubahan *flavor* yang disebabkan oleh pembentukan peptida-peptida rantai pendek dan asam-asam amino serta lepasnya komponen-komponen *flavor* non protein dari bahan baku. Hidrolisis secara

enzimatis berbagai sumber protein tanaman seperti protein tepung wijen *defatted* (Liu dan Chiang, 2008), protein kedelai (Chen *et al.*, 1995), protein gandum (Zhu *et al.*, 2006), protein *chickpea* (Li *et al.*, 2008), protein *hordein barley* (Bamdad *et al.*, 2011) dan protein bungkil *palm kernel* (Zarei *et al.*, 2012) menghasilkan hidrolisat protein dengan kemampuan antioksidan. Protein merupakan suatu zat makanan yang berfungsi sebagai bahan bakar, zat pembangun dan pengatur dalam tubuh (Sari, 2011). Protein mempunyai struktur yang mengandung N, C, H, O, kadang mengandung S, P, dan Fe (Sudarmadji, 1989). Molekul protein tersusun dari sejumlah asam amino yang saling berikatan oleh suatu ikatan yang dinamakan peptida. Asam amino dan peptida dapat dihasilkan dengan cara menghidrolisis protein. Menurut Haslaniza *et al.* (2010), hidrolisis protein merupakan protein yang mengalami degradasi hidrolitik dengan asam, basa, atau enzim proteolitik yang menghasilkan produk berupa asam amino dan peptida. Beberapa enzim proteolitik termasuk Alkalase, Protease, Papain atau Bromelin biasa digunakan untuk menghidrolisis protein ikan untuk produksi hidrolisat protein (Chalamaiah, 2012).

Hidrolisis enzimatis dilakukan dengan menggunakan satu jenis enzim, ataupun beberapa jenis enzim yang berbeda yang penambahan enzimnya perlu dilakukan pengaturan pada kondisi pH dan suhu optimum. Dibandingkan dengan hidrolisis secara kimia (menggunakan asam atau basa), hidrolisis enzimatis lebih menguntungkan karena tidak mengakibatkan kerusakan asam amino dan asam-asam amino bebas serta peptida dengan rantai pendek yang dihasilkan lebih bervariasi, reaksi dapat dipercepat kira-kira 10¹² sampai 10²⁰, tingkat kehilangan asam amino esensial lebih rendah, biaya produksi relatif lebih murah dan menghasilkan komposisi asam amino tertentu terutama peptida rantai pendek (dipeptida dan tripeptida) yang mudah diabsorpsi oleh tubuh (Giyatmi, 2001). Proses hidrolisis diperlukan bantuan enzim, salah satu enzim yang berperan dalam industri pangan adalah enzim protease. Protease adalah enzim yang berperan dalam reaksi pemecahan protein. Protease juga disebut sebagai enzim yang menghidrolisis ikatan peptida pada molekul protein yang menghasilkan peptida atau asam amino. Keberhasilan untuk mendapatkan potongan peptida yang

bersifat bioaktif sangat ditentukan oleh sumber protein dan spesifitas enzim, sehingga pemilihan enzim merupakan tahap penting untuk mendapatkan peptida bioaktif dan akan menentukan bioaktivitas peptida yang dihasilkan (Kumar *et al.*, 2013).

Protein terdiri atas molekul asam amino yang bervariasi jumlahnya, berkisar antara 10 sampai ribuan yang berfungsi sebagai unit penyusun polimer protein yang terangkai melalui ikatan peptida. Enzim ini akan mengkatalisis reaksi-reaksi hidrolisis, yaitu reaksi yang melibatkan unsur air pada ikatan spesifik substrat. Menurut Belkaaloul *et al.*, (2010), selama proses hidrolisis protein oleh enzim proteolitik berlangsung terjadi memecah protein menjadi fraksi-fraksi protein yang lebih kecil. Reaksi hidrolisis menggunakan enzim dalam pemecahan peptida menurut Peterson (1981) dapat dilihat pada Gambar 2.5.

1. Enzim membuka ikatan peptida



2. Proton mengalami pertukaran



Gambar 2.5 Hidrolisis ikatan peptida oleh enzim protease

Selain itu penentuan berat molekul, titik isoelektrik dan struktur enzim tersebut digunakan untuk mengetahui golongan fungsional pada lokasi aktif dan urutan asam amino enzim. Dilihat dari letak pemutusan ikatan peptida, protease dibedakan menjadi endopeptidase atau proteinase (EC3.4.21-99) dan eksopeptidase (EC 3.4.11-21). Endopeptidase memutuskan ikatan peptida yang berada di dalam rantai protein sehingga dihasilkan peptida dan polipeptida, sedangkan eksopeptidase menguraikan protein dari ujung rantai sehingga dihasilkan satu asam amino dan sisa peptida (Witono, 2009).

2.7 Peptida yang Bersifat Sebagai Antioksidan

Senyawa bioaktif merupakan senyawa yang mempunyai efek fisiologis dalam tubuh yang berpengaruh positif terhadap kesehatan manusia. Peptida bioaktif didefinisikan sebagai fragmen dari protein yang jika menempel pada ujung tertentu memberikan efek menyehatkan. Peptida bioaktif memiliki urutan

asam amino yang pasti dengan protein aslinya sendiri tidak memiliki keaktifan biologis dan menunjukkan sifat-sifat spesifik setelah lepas dari atau dilepaskan dari molekul protein aslinya oleh kerja enzim. Telah diketahui bahwa selama hidrolisis dalam saluran pencernaan atau selama pengolahan pangan (fermentasi), peptida tersebut dapat dilepaskan dari protein, dan kemudian di dalam tubuh dapat bekerja sebagai senyawa regulator yang aktivitasnya menyerupai hormon. Peptida juga memiliki aktivitas biologis lain seperti antihipertensi, antioksidatif, antitrombotik, hiperkolestolemik (sistem kardiovaskuler), anti selera makan, antimikroba (sistem gastrointestinal), imodulator, sitomodulator (sistem *immune*) (Korhonen dan Pihlanto, 2006).

Beberapa penelitian tentang pencernaan secara *in vitro* membuktikan bahwa peptida yang dihasilkan dari protein makanan tertentu oleh enzim pencernaan manusia memiliki aktivitas antioksidan yang kuat. Peptida ini menghambat peroksidasi lipid dan menetralkan hidroksil dan radikal superoksida. Antioksidan digunakan untuk melindungi DNA terhadap kerusakan radikal. Pada dasarnya hidrolisat protein hewani dan nabati semuanya mengandung peptida antioksidan. Tidak semua peptida bersifat antioksidasi dan beberapa ada yang prooksidasi. Umumnya antioksidan peptida mampu bertindak sebagai pengikat radikal bebas, donor proton dan menghambat pengikatan ion logam. Peptida antioksidan umumnya terdiri dari 2 hingga 10 residu asam amino, dan urutan asam amino menjadi faktor penentu keberhasilan antioksidan peptida.

Keberadaan asam amino tertentu terutama histidin, tirosin, triptofan, methionin, sistein dan prolin, berkorelasi signifikan dengan aktivitas peptida menangkap radikal bebas. Pengikatan ion logam oleh peptida juga bisa merubah siklus redoks yang sangat penting untuk beberapa oksidasi pembentukan logam. Menggunakan ferritin (serum polipeptida) sebagai contoh, ion (Fe^{3+}) yang tidak terlalu reaktif dibatasi dalam rongga polipeptida, membentuk atom dan bersatu membentuk $\text{Fe}(\text{OH})^3$ yang tidak bisa dikonversi menjadi ion (Fe^{2+}) yang lebih reaktif. Terganggunya keseimbangan redoks besi menyebabkan berkurangnya Fe^{2+} bebas, dengan demikian mencegah penguraian hidroperoksida (Xiong, 2010). Peptida hasil pemecahan protein mengalami perubahan karakteristik fisik

dan kimia dari protein alaminya sebelum mengalami degradasi. Peptida tidak berasa atau pahit kecuali peptida yang mengandung glutamat atau asam aspartat yang berasa manis. Peptida juga mempunyai berat molekul rendah sehingga kurang menimbulkan alergi dibandingkan dengan protein alamiahnya. Peptida yang mempunyai aktivitas antioksidan pada umumnya ukuran molekulnya kecil dengan berat molekul lebih rendah dari 3000 Da atau 3kDa.

Berlett dan Levine (2014) menambahkan bahwa asam amino metionin, sistein dan aromatik seperti tirosin, histidin, fenilalanin dan triptofan menunjukkan aktivitas antioksidan jauh lebih tinggi dibandingkan asam amino yang lain. Aktivitas antioksidan terhadap radikal superoksida lisin dan leusin menunjukkan aktivitas tinggi. Sabahelkheir *et al.*, 2012 melaporkan bahwa keberadaan asam amino yang bertanggung jawab terhadap antioksidan terutama fenilalanin dan histidin yang cukup tinggi menandakan kemungkinan keberadaan peptida yang bersifat antioksidan yang tinggi pula.

Hidrofobisitas menjadi faktor penting yang berperan dalam aktivitas antioksidan suatu peptida (Mundi dan Aluko, 2014). Seperti telah dilaporkan oleh Pownall *et al.* (2010) aktivitas antioksidan lebih berhubungan dengan kandungan total asam amino hidrofobik daripada ukuran peptida. Pendapat yang sama dilaporkan oleh Ajibola *et al.* (2011) yang menyatakan bahwa aktivitas yang tinggi pada fraksi peptida <1 kDa dari biji bengkuang disebabkan oleh jumlah total asam amino hidrofobik dan aromatik. Selain hidrofobisitas, muatan dan komposisi asam amino aromatik juga menjadi penentu aktivitas antioksidan (Udenigwe dan Aluko, 2011).

BAB 3. METODE PENELITIAN

3. 1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia dan Biokimia Pangan dan Hasil Pertanian, Laboratorium Rekayasa Pangan dan Hasil Pertanian, Laboratorium Analisa Terpadu Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember. Waktu penelitian pada bulan November 2017 hingga Juni 2018.

3. 2 Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini meliputi bahan baku dan bahan kimia. Bahan baku yang digunakan berupa biji koro pedang varietas koro pedang tubuh tegak dan berbiji putih (*Canavalia ensiformis* (L.) DC) yang diperoleh dari desa Cerme, Kabupaten Bondowoso dan ekstrak kasar enzim protease biduri dari getah tanaman biduri (*Calotropis gigantea*) yang disadap dari pantai Watu Ulo kecamatan Ambulu Kabupaten Jember.

Bahan kimia yang digunakan adalah akuades, NaOH, buffer fosfat pH 7 (Na_2HPO_4 dan NaH_2PO_4), Na_2CO_3 , *Coomassie brilliant blue*, HCL, TCA, kasein, *follin ciocalteau*, tirosin, etanol, etanol p.a, DPPH (*1,1 diphenyl-1-2 Picrylhidrazil*), buffer fosfat, potassium ferricyanide, FeCl_3 , asam askorbat, selenium, H_2SO_4 , NaOH, asam borat, buffer ekstraksi (MOPS-NaOH pH 7,5, EDTA, MgCl, Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride (PMSF)), reagen Bradford, *buffer loading*, (Tris-Cl 0,5 M pH 6,8; SDS; glycerol; bromophenol blue), akrilamide, buffer elektroda (glycine 192 mM, Tri base 25 mM, SDS), *Coomassie Brilliant Blue* (CBB), SDS (*Sodium Deodecyl Sulphate*), marker SDS-PAGE, kalium ferricyanide, besi klorida, ferrozinedan antioksidan sintetik BTH (*butylated hydroxytoluena*).

3.2.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi ayakan 80 mesh ,pH meter Jen Way tipe 3320 (Jerman), neraca analitik Ohaus, *centrifuge* Yenaco model YC-1180, blender, pH meter (Jen Way tipe 3320), *waterbath* GFL 1083,

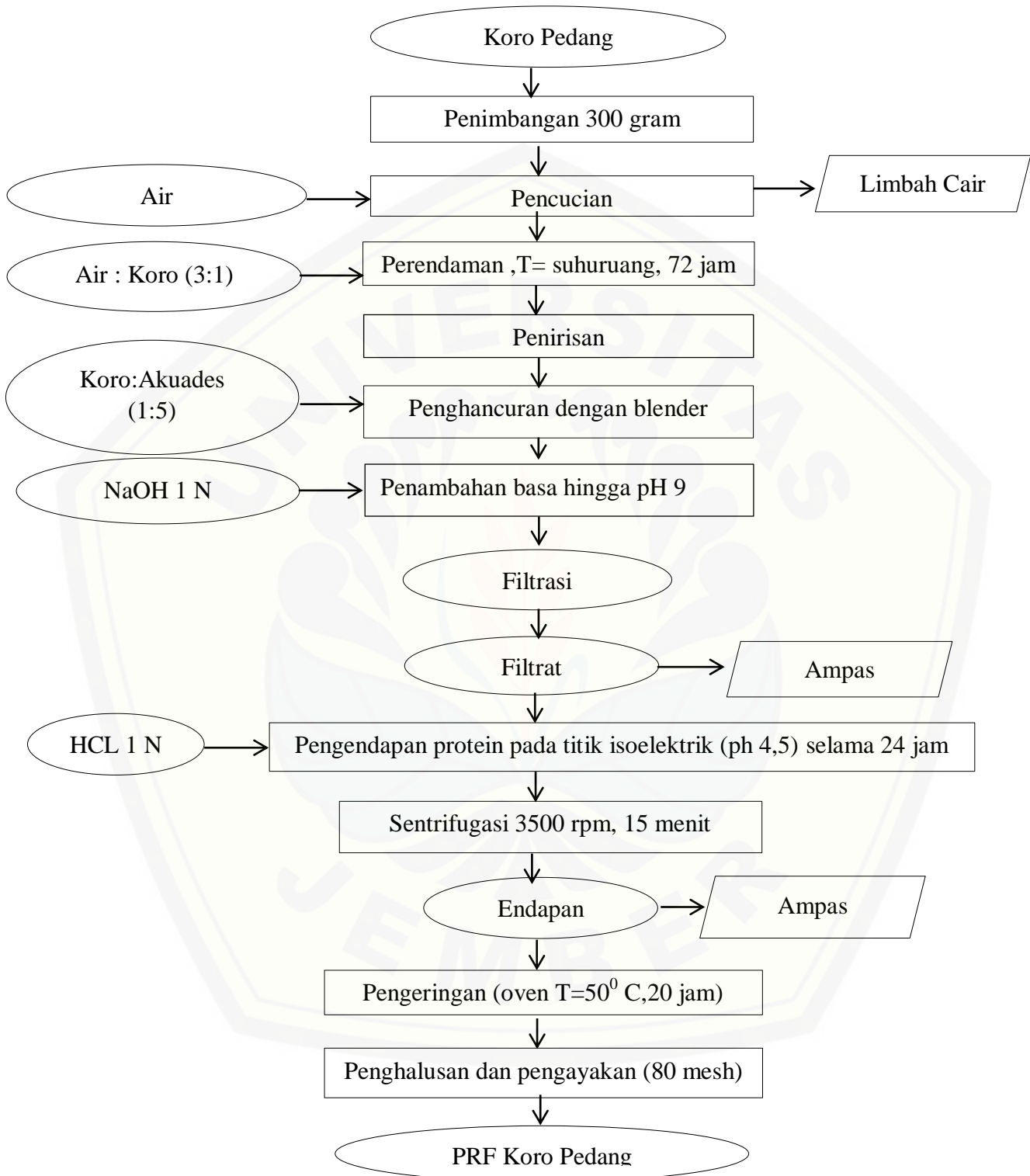
freeze dryer, spektrofotometer merk Shimadzu, vortex Thermolyne type 16700, oven vakum (Memmert), lemari pendingin, *freezer*, magnetic stirer, pipet mikro, bulb pipet, alat-alat gelas (Pyrex dan Duran), satu unit elektroforesis, kromatografi gel filtrasi (*gel filtration chromatography*), HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) merk Shimadzu.

3.3 Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 2 faktor yaitu variasi konsentrasi enzim dan lama hidrolisis yang digunakan dalam hidrolisis PRF (*Protein Rich Flour*) koro pedang. Faktor A yaitu lama hidrolisis 0 jam; 1,5 jam dan 3 jam sedangkan faktor B yaitu konsentrasi enzim 1%; 2% dan 3%. Pada setiap perlakuan dilakukan pengulangan 3 kali sehingga diperoleh 9 sampel. Data hasil pengamatan akan dianalisis menggunakan sidik raga (ANNOVA) pada taraf uji 5%. Perlakuan yang menunjukkan perbedaan nyata akan diuji lanjut menggunakan uji DMRT dengan aplikasi SPSS.

3.4 Pelaksanaan Penelitian

Produksi hidrolisat protein PRF koro pedang diawali dengan pembuatan sampel PRF koro pedang. Proses pembuatan PRF koro pedang berdasarkan penelitian Wiwik *et al.*, (2010) dengan adanya modifikasi. Koro pedang yang digunakan adalah biji koro hasil sortasi atau biji koro yang masih berkualitas baik sehingga tidak menjadi faktor dalam tahap hidrolisis enzim. Produksi hidrolisat PRF koro pedang lebih detail dapat dilihat pada Gambar 3.1

3.4.1 Produksi PRF (*Protein Rich Flour*) Koro Pedang

Gambar 3.1 Produksi PRF Koro Pedang
Sumber : Windrati *et al.*, 2010

Perlakuan pendahuluan dalam pembuatan PRF koro pedang adalah menyiapkan biji koro pedang putih sebanyak 300 gram kemudian dicuci untuk menghilangkan kotoran yang masih tersisa pada biji seperti sisa daun, debu dan pasir. Sortasi biji koro pedang diantaranya biji bopeng, biji berjamur, biji rusak, lalu perendaman pada suhu ruang (25-30 °C) selama 3 hari (72 jam) dengan perbandingan air dan koro pedang (3:1). Perendaman selama 72 jam dilakukan pergantian air tiap 6 jam sekali hal ini berguna untuk menghilangkan senyawa glukosianida, memudahkan hidrolisis, menginaktivasi enzim lipoksigenase atau mengurangi senyawa antitripsin yang dapat menghambat kerja enzim pada biji koro pedang. Biji koro setelah perendaman ditiriskan dan diekstraksi menggunakan blender dengan penambahan akuades perbandingan 1:5 (koro pedang : akuades).

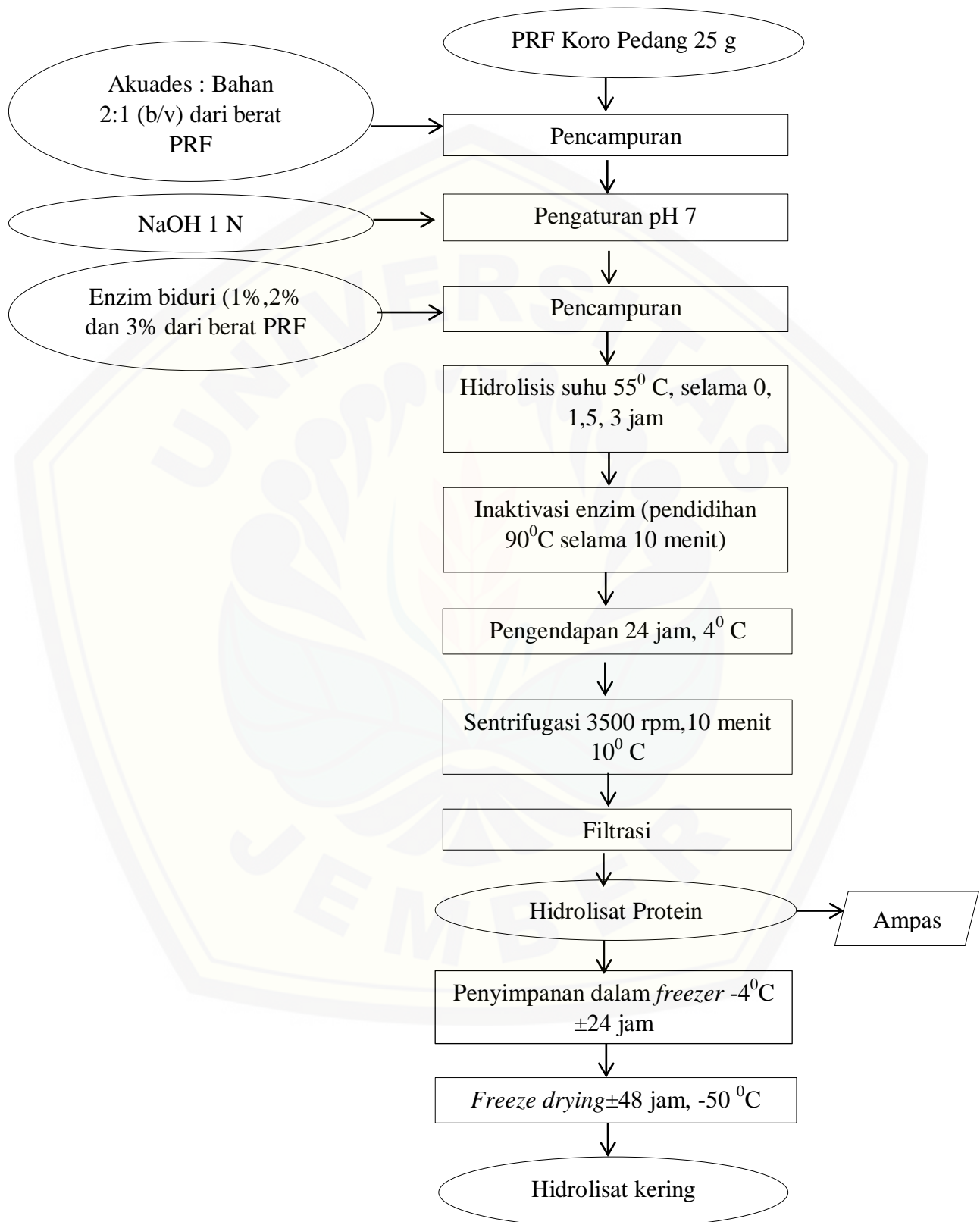
Proses ekstraksi menggunakan blender untuk memperluas permukaan koro pedang dan mempermudah dalam tahapan analisis protein kemudian pengaturan pH 8-9 dengan menggunakan NaOH 1 N untuk mempermudah proses ekstraksi karena beberapa protein dapat larut pada pH basa. Biji koro setelah ditambah basa diambil filtratnya menggunakan kain saring dan ampasnya dibuang, filtrat lalu dilakukan pengendapan protein pada titik isoelektrik (pH 4,5) dengan menggunakan HCL 1 N sehingga dihasilkan endapan, selanjutnya filtrat hasil pengendapan dibuang. Pengeringan dengan oven vakum suhu 50 °C selama 24 jam lalu ditepungkan dan dilakukan pengayakan dengan ayakan ukuran 80 mesh sehingga akan dihasilkan PRF koro pedang dalam bentuk serbuk kering.

3.4.2 Pembuatan Hidrolisat PRF Koro Pedang

PRF (*Protein Rich Flour*) koro pedang sebanyak 50 gram ditambahkan air dengan perbandingan 2:1 dari berat PRF yang dihasilkan dan ditambahkan NaOH 1 N untuk pengaturan pH 7, pengaturan pH ini dilakukan karena enzim protease dapat bekerja efektif pada kondisi lingkungan dengan pH 7. Suspensi PRF koro pedang dengan pH 7 ditambahkan enzim biduri dengan berbagai konsentrasi yaitu 1%; 2% dan 3%. Konsentrasi biduri yang ditambahkan berdasarkan berat PRF sebelum dilakukan pengukuran. Suspensi PRF dihidrolisis dengan berbagai variasi waktu yaitu 0 jam; 1,5 jam dan 3 jam. Sampel selanjutnya

didihkan dengan suhu 90 °C selama 10 menit untuk menginaktivasi enzim. Hidrolisat yang dihasilkan dilakukan pengendapan 24 jam pada suhu 4⁰ C hal ini digunakan untuk mencegah kemungkinan proses hidrolisis yang masih berlangsung. Hidrolisat di sentrifugasi kecepatan 3500 rpm selama 10 menit dengan suhu 10⁰ C untuk memisahkan fraksi tidak terlarut dan fraksi terlarut (supernatan) serta komponen lemak yang mungkin terikut selama produksi PRF koro pedang.

Setelah dilakukan sentrifugasi maka akan terbentuk 2 jenis lapisan pada tabung sentrifugasi. Bagian atas merupakan supernatan berupa cairan yang mengandung protein yang telah dipecah menjadi asam amino-asam amino atau komponen yang lebih kecil, sementara bagian bawah merupakan sisa proses sentrifugasi yang berbentuk endapan yang tidak mengandung protein yang disebut pellet. Bagian atas tersebut yang kemudian disebut dengan hidrolisat basah. Hidrolisat lalu disaring menggunakan kertas saring agar didapatkan hidrolisat yang jernih sehingga memudahkan analisa antioksidan, lalu hasil filtrasi disimpan dalam *freezer*. Hidrolisat beku di *freeze drying* selama 48 jam hal ini berguna untuk menghilangkan air yang terdapat pada hidrolisat dengan menggunakan tekanan rendah dan tanpa adanya panas sehingga tidak merusak komponen protein pada hidrolisat. Ekstraksi protease biduri yang digunakan pada penelitian ini mengacu pada metode Witono, (2002) yaitu tentang produksi enzim protease dari perlakuan dalam pengambilan getah, penyimpanan getah hingga ke tahap produksi protease biduri. Pembuatan hidrolisat PRF koro pedang dapat dilihat pada Gambar 3.2.



Gambar 3.2 Produksi hidrolisat kering

3.5 Parameter Pengamatan

Parameter yang diamati untuk hidrolisat PRF koro pedang menggunakan enzim biduri yaitu sebagai berikut:

1. Kadar Protein (AOAC, 2005)
2. Derajat Hidrolisis (Hasnaliza *et al.*, 2010)
3. Distribusi Berat Molekul (Laemmli, 1970).
4. Komposisi Asam Amino (AOAC, 2005).
5. Aktivitas Antioksidan
 - a. Metode DPPH dan IC_{50} (*1,1-diphenil-1-2-Picrylhidroksil*, Shimada *et al.*, 1992)
 - b. *Reducing Power* (Oyaizu,1986)

3.6 Prosedur Analisa

3.6.1 Total Nitrogen atau Kadar Protein

Perhitungan total nitrogen berdasarkan metode AOAC (2005) yang prinsipnya dari analisis total nitrogen sama dengan analisis protein tanpa dikalikan dengan faktor konversi. Presentase total nitrogen dan kadar protein dianalisis dengan menggunakan metode Kjeldahl. Tahapan yang dilakukan dalam analisis protein terdiri dari tiga tahap yaitu dekstruksi, destilasi dan titrasi. Sampel masing-masing sebanyak 5 ml hidrolisat PRF dimasukkan ke dalam labu Kjeldahl, lalu ditambahkan 0,9 gram selenium dan 2 ml H_2SO_4 pekat. Sampel didekstruksi pada suhu $410^{\circ}C$ selama kurang lebih 1 jam sampai larutan jernih lalu didinginkan. Setelah dingin ditambahkan 50 ml akuades dan 20 ml NaOH 40% dalam labu Kjeldahl, kemudian dilakukan proses destilasi dengan suhu destilator $100^{\circ}C$. Hasil destilasi ditampung dalam labu erlenmeyer 250 ml yang berisi campuran 15 ml asam borat (H_3BO_3) 4 % dan 2 tetes indikator MmMb yang berwarna ungu. Setelah volume destilat mencapai 40 ml dan berwarna kehijauan, maka proses destilasi dihentikan. Lalu destilat dititrasi dengan HCL 0,1 N sampai terjadi perubahan warna biru keunguan. Volume titran dibaca dan dicatat kemudian larutan blanko dianalisis seperti sampel. Penggunaan metode Kjeldahl dikalikan dengan faktor konversi yaitu $\%N \times 6,25$. Presentase total nitrogen dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Total nitrogen} = \frac{(\text{ml HCL} - \text{ml blanko}) \times N \text{ HCL} \times 14.008}{\text{gram sampel}} \times 100\%$$

3.6.2 Derajat Hidrolisis

Derajat hidrolisis (DH) diartikan sebagai perbandingan jumlah ikatan peptida yang dihidrolisa per gram protein dengan jumlah total ikatan peptida yang dihidrolisis. Selama proses hidrolisis terjadi pemutusan ikatan peptida pada protein oleh enzim proteolitik. Persentase ikatan peptida yang terlepas akibat proses hidrolisis dinyatakan dengan derajat hidrolisis. Derajat hidrolisis dalam proses hidrolisis PRF koro pedang dapat diukur dengan metode *soluble nitrogen after trichloro acid precipitation* (SN-TCA). Prinsip pengukuran SN-TCA ini yaitu dengan dilakukan pengukuran kadar nitrogen yang terlarut dalam larutan asam trikloroasetat (TCA), setelah komponen yang tidak terlarut mengalami pengendapan akibat proses sentrifugasi (Rutherford, 2010). Derajat hidrolisis dihitung berdasarkan persentase rasio *trichloroacetic acid* (TCA) menggunakan metode menurut Hasnaliza, 2010. Sebanyak 20 mL hidrolisat protein ditambahkan TCA 10% (b/v) sebanyak 20 mL. Campuran tersebut kemudian didiamkan selama 30 menit agar terjadi pengendapan, lalu disentrifugasi (kecepatan 7.800 x g, selama 15 menit). Supernatannya lalu dianalisis kadar nitrogennya menggunakan metode Kjeldahl. Derajat hidrolisis dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Hidrolisis} = \frac{\text{nitrogen terlarut dalam TCA 10\% (b/v)}}{\text{nitrogen total sampel}} \times 100\%$$

3.6.3 Distribusi Berat Molekul

Penelitian ini dilakukan pengukuran berat molekul menggunakan SDS PAGE (*Sodium Dodecil Sulphate Polyacrilamide Gel Electrophoresis*) (Laemmli 1970). Semua teknik elektroforesis membutuhkan arus listrik untuk menggerakkan molekul bermuatan melalui matriks atau gel. Identifikasi dan analisis pola SDS-PAGE dilakukan dengan membandingkan pita protein sampel dengan protein standar. Berikut merupakan langkah analisis distribusi berat molekul protein menggunakan SDS-PAGE :

1. Ekstraksi protein

Sebanyak 0,25 gram hidrolisat protein berbentuk padatan serbuk ditambahkan 0,75 ml buffer ekstraksi mengandung 50 mM MOPS-NaOH (pH 7,5), 1

mMEDTA, 10 mM MgCl dan 1 mM *Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride* (PMSF) dihomogenkan. Homogenat kemudian di sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 40 °C. Supernatan yang didapat dipindah di *microtube* baru dan disimpan dalam suhu -80 °C untuk dilakukan analisa.

2. Pengukuran kandungan protein

Pengukuran kandungan protein dilakukan dengan menggunakan metode Bradford (1976). Sebanyak 5 µl supernatan ekstrak protein ditambahkan 950,5 µl reagen Bradford lalu dihomogenkan menggunakan vortex dan diinkubasi selama 15 menit. Warna yang terbentuk diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm. Kandungan protein total dihitung dengan mengkonversikan nilai absorbansi sampel kedalam persamaan regresi linier dari standar protein BSA yang telah dibuat sebelumnya. Hasil perhitungan konsentrasi protein kemudian digunakan untuk menentukan volume sampel yang akan dianalisis.

3. Analisa SDS-PAGE

Analisa SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis*) dilakukan menggunakan metode yang disebutkan oleh Laemmli (1970). Larutan hasil pengujian *heat stability* ditambahkan buffer *loading* (Tris-Cl 0,5 M pH 6,8 ; SDS 10% ; glycerol 10% ; *bromophenol blue*) dan didenaturasi dengan pemanasan 100 °C selama 3 menit. Sampel protein kemudian dimasukkan kedalam sumuran gel lalu dipisahkan dengan menggunakan (SDS-PAGE) dengan konsentrasi akrilamide 15%. Pemisahan protein dengan SDS-PAGE dilakukan dengan arus listrik 50-95 Volt selama 5 jam dalam buffer elektroda (glycine 192 mM, Trisbase 25 mM, SDS 0,1 %). Protein yang terpisah diwarnai dengan *Coomassie Brilliant Blue* (CBB). Protein marker menggunakan *Blue Prestained Protein Standar* sebanyak 3 µl.

3.6.4 Komposisi Asam Amino

Pengukuran komposisi asam amino pada penelitian ini yaitu menggunakan metode AOAC, 2005. Prinsip analisis pada metode ini yaitu menggunakan HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) dengan memanfaatkan reaksi

prakolom gugus amino yaitu pereaksi *ortoftalaldehida* (OPA) yang akan bereaksi dengan asam amino primer dalam suasana basa. *Merkaptoetanol* membentuk senyawa yang berfluoresensi sehingga dapat dideteksi dengan detektor fluoresensi. Berikut merupakan langkah analisis asam amino menggunakan HPLC.

1. Preparasi sampel

Sampel yang mengandung 3 mg protein dimasukkan ke dalam tabung ulir, ditambahn 1 ml HCL 6 N dan dialiri gas N₂ kemudian ditutup. Sampel tersebut dihidrolisis dalam oven bersuhu 110⁰C selama 24 jam lalu disaring menggunakan penyaring kaca masir. Sampel kemudian dipindahkan ke labu *rotary evaporator* untuk dikeringkan, ditambah dengan HCL 0,01 N dan ditera sampai 5 ml, kemudian disaring dengan kertas milipore N0. 45.

2. Analisis asam amino dengan menggunakan HPLC

Larutan buffer kalium borat pH 10,4 ditambahkan ke dalam sampel dengan perbandingan 1:1 sehingga diperoleh larutan sampel yang siap dilakukan analisis. Larutan sampel sebanyak 10 µL dicampur dengan 25µL pereaksi ortoftalaldehida (OPA). Hal yang sama juga dilakukan pada larutan standar asam amino. Larutan yang telah dicampur (baik sampel maupun standar) didiamkan selama 1 menit agar derivatisasi berlangsung sempurna. Larutan standar diinjeksikan ke dalam kolom HPLC sebanyak 5µL, lalu ditunggu sampai pemisahan semua asam amino selesai. Kondisi alat HPLC pada saat dilakukan analisis :

Kolom : Ultra techspere

Fase gerak : larutan A (Na-asetat, Na-EDTA, metanol, THF) dan larutan B (metanol 95%, akuades)

Detektor: Flouresensi

Konsentrasi asam amino (µmol) dalam sampel dihitung menggunakan rumus:

$$\mu \text{ mol AA} = \frac{\text{luas puncak sampel}}{\text{luas puncak standart}} \times \text{konsentrasi standar}$$

Persen asam amino dalam sampel dapat dihitung dengan rumus:

$$\% \text{ Asam Amino} = \frac{\mu \text{ mol Asam amino} \times \text{Mr Asam amino}}{\mu \text{ g sampel}} \times 100\%$$

3.6.5 Aktivitas Antioksidan

a. DPPH (% *Radical Scavenging Activity*)

Aktivitas antioksidan dalam bahan dianalisis berdasarkan kemampuan menangkap radikal bebas (*Radical Scavenging Activity*) DPPH menurut metode Shimada *et al.*, (1992) dengan modifikasi. Pengukuran DPPH dilakukan dengan mengencerkan sampel hidrolisat terlebih dahulu, pengenceran yang digunakan adalah 1000 ppm dengan menggunakan sampel 0,01 g dilarutkan kedalam labu takar 10 ml etanol 70%. Kemudian dilakukan pengenceran DPPH 0,1 mM, sebanyak 0,00197 g DPPH dilarutkan ke dalam 50 ml etanol pa dengan menggunakan labu ukur 50 ml. Hidrolisat PRF yang telah diencerkan dengan etanol 70% diambil 1,5 ml begitu juga larutan DPPH 0,1 mM diambil sebanyak 1,5 ml lalu direaksikan dalam tabung reaksi. Campuran tersebut kemudian dilakukan homogenisasi dengan vortex kurang lebih 1 menit kemudian dilakukan inkubasi pada suhu 37 °C selama 30 menit di dalam *waterbath*. Absorbansi sampel diukur pada panjang gelombang 517 nm untuk mengetahui persen inhibisi terhadap radikal DPPH.

b. IC₅₀

Selain dilihat dari segi kemampuan persen penghambatan, kemampuan oksidatif suatu bahan atau hidrolisat dapat dilihat dari seberapa besar jumlah antioksidan tersebut meredam 50% radikal bebas yang bereaksi. Metode tersebut ditentukan dengan menggunakan perhitungan IC₅₀. Nilai IC₅₀ akan semakin besar jika ekstrak yang terlarut pada pelarut yang digunakan semakin sedikit. Cara pengujiannya dengan melarutkan sampel hidrolisat kering ke dalam etanol 70% dengan berbagai konsentrasi. Hidrolisat protein dilarutkan dengan konsentrasi 500, 1000, 1500, 2000 dan 2500 ppm dan sebagai kontrol positif digunakan antioksidan sintetis BHT (*Butylated hydroxytoluene*) dibuat dengan cara melarutkan dalam pelarut etanol pa

dengan konsentrasi 2, 4, 6, 8 dan 10 ppm. Larutan sampel, larutan blanko dan larutan antioksidan pembanding diambil atau antioksidan sintetis diambil sebanyak 1,5 ml dan direaksikan dengan larutan DPPH 0,1 mM sebanyak 1,5 ml dalam tabung reaksi. Campuran kemudian dilakukan homogenisasi dengan vortex dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 30 menit dalam *waterbath*. Larutan dapat diukur absorbansinya dengan panjang gelombang 517 nm. Aktivitas antioksidan DPPH dapat dihitung dengan menggunakan persamaan berikut:

$$\% \text{inhibisi} = \frac{\text{absorbansi blanko} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi blanko}} \times 100\%$$

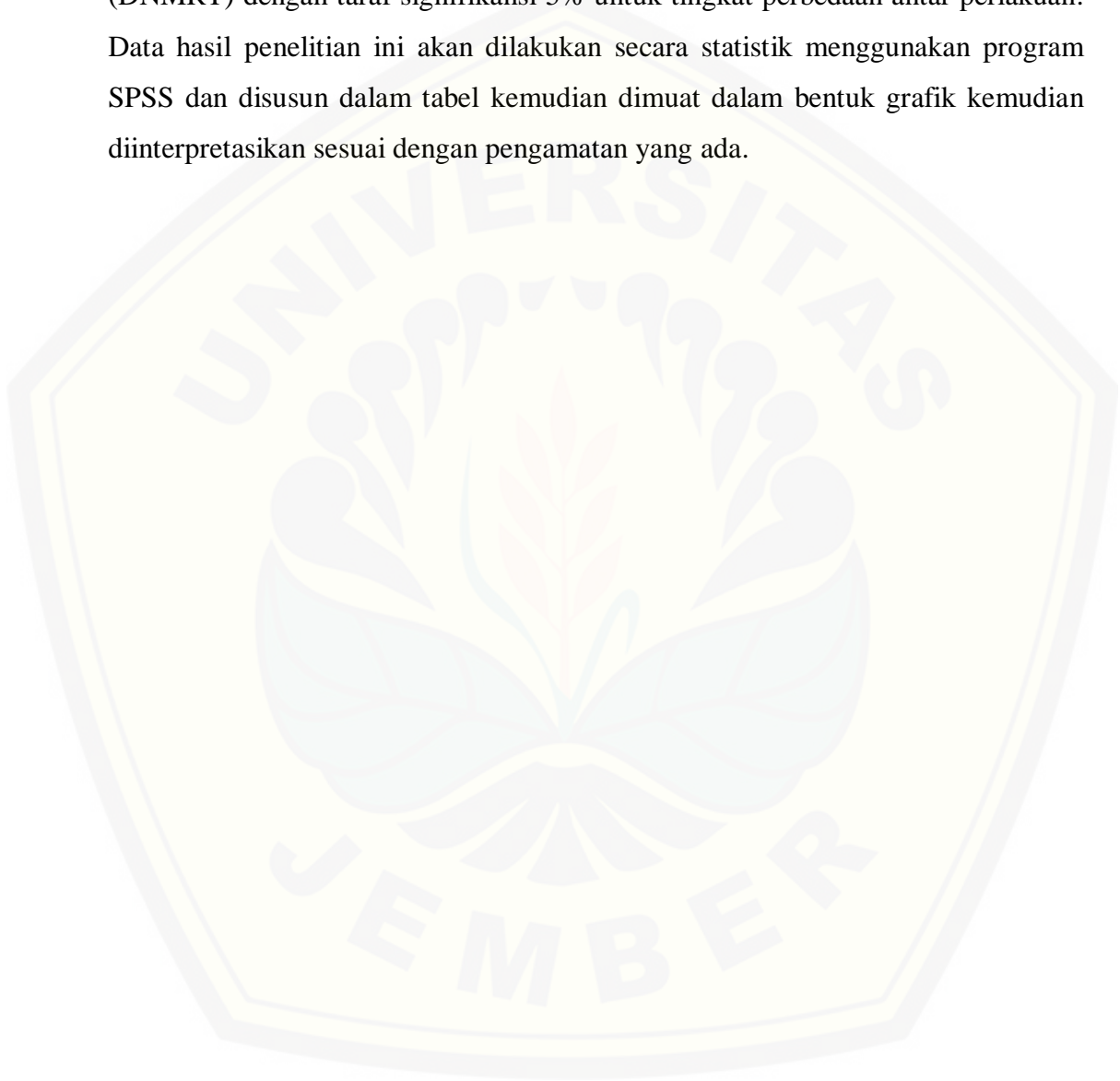
Setelah didapatkan presentase inhibisi dari masing-masing konsentrasi, persamaan $y=ax+b$ ditentukan dengan perhitungan secara regresi linier dimana x adalah konsentrasi (ppm) dan y adalah persen inhibisi (%). Persamaan tersebut digunakan untuk mencari nilai IC_{50} (*Inhibitor Concentration 50%*) dari masing-masing sampel dengan menyatakan nilai y sebesar 50 dan nilai x yang akan diperoleh sebagai nilai IC_{50} . Nilai IC_{50} menyatakan besarnya konsentrasi larutan sampel yang dibutuhkan untuk mereduksi radikal bebas DPPH sebesar 50%.

c. *Reducing power*

Reducing power dari hidrolisat *protein rich flour* koro pedang ditentukan menurut metode dari Oyaizu (1988). Sebanyak 1 mL sampel hidrolisat PRF yang telah dilarutkan dalam etanol 70% dengan konsentrasi 1000 ppm (0,001g/ 1ml) ditambahkan ke 2,5 mL dalam 0,2 mM bufer fosfat (pH 6,6) dan 2 ml (konsentrasi 1%) kalium ferricyanide. Campuran reaksi diinkubasi pada 50° C selama 20 menit dan kemudian ditambahkan 2 mL (konsentrasi 10%) TCA. Campuran kemudian dilakukan pendiaman selama 10 menit. Sebanyak 2 mL dari supernatan dicampur dengan 2 mL akuades dan 0,4 mL besi klorida (konsentrasi 0,1%). Absorbansi larutan yang dihasilkan tercatat sebesar 700 nm setelah 10 menit. Peningkatan absorbansi mengidentifikasi peningkatan aktivitas *reducing power*. Sebagai kontrol positif, digunakan asam askorbat dibuat dengan cara melarutkan dalam akuades dengan konsentrasi 2, 4, 6, 8 dan 10 ppm.

3.7 Analisa Data

Data yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan *Analysis of Variance test* (ANOVA). Jika data yang dihasilkan berbeda nyata akan dilanjutkan dengan uji lanjut menggunakan *Duncan's Multiple Range Test* (DNMRT) dengan taraf signifikansi 5% untuk tingkat perbedaan antar perlakuan. Data hasil penelitian ini akan dilakukan secara statistik menggunakan program SPSS dan disusun dalam tabel kemudian dimuat dalam bentuk grafik kemudian diinterpretasikan sesuai dengan pengamatan yang ada.



BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian maka dapat disimpulkan bahwa:

1. Konsentrasi enzim dan lama hidrolisis berpengaruh nyata terhadap presentase kadar protein dan derajat hidrolisis, kadar protein hidrolisat PRF antara 39,067-70,436%, derajat hidrolisis antara 9,034-30,421%, distribusi berat molekul perlakuan terbaik sebesar 18,070-127,351 kDa serta residu komposisi asam amino dengan nilai tertinggi yaitu asam glutamat sebesar 11,050 %.
2. Aktivitas antioksidan hidrolisat PRF koro pedang paling tinggi didapatkan pada konsentrasi enzim 3% dan lama hidrolisis 3 jam dengan %RSA sebesar 14,748%, nilai IC_{50} 3218,220 ppm dapat menghambat (%RSA) >50% radikal bebas DPPH, dan nilai *reducing power* sebesar 0,223.

5.2 Saran

Adapun saran yang dapat digunakan untuk penelitian selanjutnya yaitu:

1. Diperlukan adanya penelitian lebih lanjut tentang uji aktivitas antioksidan lainnya seperti *metal chelating*, persentase penghambatan ABTS, FRAP, OH hidroksil dan analisis aktivitas antioksidan lainnya.
2. Diperlukan juga penelitian tentang urutan asam amino dalam peptida (*sequences*) yang bersifat sebagai aktivitas antioksidan.

DAFTAR PUSTAKA

- Adinarayana, K., P. Ellaiah, dan D.S. Prasad. 2003. Purification and Partial Characterization of Thermostable Serine Alkaline Protease from a Newly Isolated *Bacillus subtilis* PE- 11, *AAPS(American Association of Pharmaceutical Scientists) Pharmacy Science Technology*, 4(4): 1-9.
- Ajibola CF, J.B Fashakin, T.N Fagbemi, dan R.E Aluko. 2011. Effect of peptida size on antioxidant properties of African yam bean seed (*Sphenostylis stenocarpa*) protein hydrolysate fractions. *International Journal Molecular Science*. 12: 6685-6702.
- Alpay, P., dan D. Aktas. 2015. Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic Usage of immobilized papain for enzymatic hydrolysis of proteins. *Journal Molecular Catalysis B; Enzimatic*. 111: 56–63.
- Amelia P., 2011. Isolasi, Eludasi Struktur dan Aktivitas Antioksidan Senyawa Kimia dari daun *Garcinia benthami* Pierre. Disertasi (*Thesis*). Depok: FMIPA Universitas Indonesia.
- AOAC. 2005. *Official Methods of Analysis*. Association of Official Analytical Chemists. Washington: Benjamin Franklin Station.
- Armala, M.M. 2009. Daya Antioksidan Fraksi Air Ekstrak Herba Kenikir (*Cosmos caudatuc* HBK) dan Profil KLT. *Skripsi*. Yogyakarta: Fakultas Farmasi UII.
- Baehaki A., D.W. Lestari, dan R.A. Romadhoni. 2015. Hidrolisis Protein Ikan Patin Menggunakan Enzim Papain dan Aktivitas Antioksidan Hidrolisatnya. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 3(18): 230-239.
- Bamdad, F., J. Wu dan L. Chen. 2011. Effects of enzymatic hydrolysis on molecular structure and antioxidant activity of barley hordein. *Journal of Cereal Science*. 54(1), 20–28.
- Barzegar, A. 2012. *Proton-Coupled Electron-Transfer Mechanism for the Radical Scavenging Activity of Cardiovascular Drug Dipyridamole*. 7(6), 1-8.
- Belkaaloul, K., A. Chekroun., A. Abdessalam., A.D. Saidi., dan O. Kheroua., 2010. Growth, Acidification and proteolysis Performance of Two Co-Cultures (*Lactobacillus Plantarum*, *Bifidobacterium Longum*, and *Streptococcus Thermophilus*, *Bifidobacterium Longum*). *African Journal Biotechnology*. 9 (10): 1463-1469.
- Berlett BS, R.L. Levine. 2014. *Designing antioxidant peptides*. *Redox Rep* 19: 80-86.

- Bordbar S, A. Ebrahimpour, A.A. Hamid, dan N. Saari. 2013. The improvement of the Enogenous Antioxidant Property of Stone Fish (*Actinopyga lecanora*) Tissue Using Enzymatic Proteolysis. *Journal of Food Science* 9: 15-18.
- Campbell, N.A., J.B Reece., and L.G. Mitchell. 2004. *Biologi*. Jilid 3. Edisi Kelima. Alih Bahasa Wasmen. Jakarta: Penerbit Erlangga.
- Carreno F.L.G., P.H. Cortes. 2000. *Use of protease inhibitors in seafood products*. Seafood Enzymes : Utilization and Influence on Postharvest Seafood Quality. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Chalamaiah, M., B. Dinesh, R. Hemalatha, dan T. Jyothirmaryl. 2012. Fish Protein Hydrolysates: Proximate Composition, Amino Acid Composition, Antioxidant Activities and Applications: A Review. *Food Chemistry* 135: 3020- 3038.
- Chen, H.M., K. Muramoto, dan F. Yamauchi. 1995. Structural analysis of antioxidative peptides from soybean b-conglycinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43: 574–578.
- Correa A., D.J Daroit, J. Coelho, S.M. Meira, F.C. Lopes, J. Segalin, P.H. Risso, dan A. Brandelli. 2011. Antioxidant, antihypertensive and antimicrobial properties of ovine caseinate hydrolyzed with microbial protease. *Journal Science Food Agricultural* 91: 2247-2254.
- Dalimartha S. 2003. *Biduri (Calotropis gigantea [Wild.] Dryand.ex W.T.Ait.)*. Pusat Data dan Informasi PERSI Jakarta.
- Damodaran, S. 1996. Amino Acids, Peptides and Protein. Di dalam: Fennema OR, editor. Food Chemistry. Edisi ke-3. Marcel Dekker, Inc. New York. Fox, P.F. *Food Enzymology*. Elsevier Applied Science. New York.
- Delatorre. P. 2008. Structure of a lectin from *Canavalia gladiata* seeds: new structural insights for old molecules. Brazil: *Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular*, Universidade Federal do Ceará, Ceará.
- Ebrahimzadeh, M.A., F. Pourmorad dan A.R. Bekhradnia. 2008. Iron Chelating Activity, Phenol and Flavonoid Content of Some Medicinal Plants from Iran. *African Journal of Biotechnology*. 7 (18), 3188-3192.
- Ekanayake, S. 2006. Canavanine Content in Sword Beans (*Canavalia gladiata*) : *Analysis and Effect of Processing*. Sri Lanka : Departement of Biochemistry, Faculty of Medical Scienses, University of Sri Jayewardenepura. 797–803.

- Ferreira, W. M., A. D. P. N. Herrera, C. Scapinello, D. O. Fontes, L. C. Machado, dan S. R. A. Ferreira. 2007. Apparent digestibility of nutrients of simplified diets based on forages for growing rabbits. *Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science* 59: 451–458.
- Gesualdo A., dan E Li-Chan. 1999. Functional Properties of Fish Protein Hydrolysate From Herring (*Clupea harengus*). *Journal of Food Science* 64: 1000-1004.
- Giyatmi. 2001. Prospek Hidrolisat Protein ikan sebagai Pemer kaya Nutrisi Makanan. *Makalah*. Bogor: Program Pasca Sarjana. Institut Pertanian Bogor.
- Gustiningsi, D. dan A. Dian. 2011. *Potensi Koro Pedang (Canapalia ensiformis) dan Saga Pohon (Aghenenthara povonina) Sebagai Alternatif Substitusi Bahan Baku Tempe*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Guo, H., Y. Kouzuma dan M. Yonekura. 2009. Structures and properties of antioxidative peptides derived from royal jelly protein. *Food Chemistry* 113, 238–245.
- Hanani E., A. Mun'im dan R. Sekarini. 2005. Identifikasi Senyawa Antioksidan dalam Spons *Callyspongia sp.* Dari Kepulauan Seribu. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. Vol. 2 (3): 127-133.
- Haslaniza, H. 2010. The Effect of Enzim Concentration, Temperature and Incubation Time on Nitrogen Content and Degree of Hydrolysis of Protein Precipitate from Cockle (*Anadara granosa*) Meat Wash Water. *International Food Research Journal*. Vol. 5 (17): 147-152.
- Holme, D.J., and H. Peck. 1998. *Analytical Biochemistry 3rd Edition*, Prentice Hall, Inggris.
- Huang Y., L. He, G. Li, N. Zhai, H. Jiang, Y. Chen. 2014. *Role of helicity of α -helical antimicrobial peptidas to improve specificity*. *Protein Cell* 5: 631-642.
- Iskandar, T. dan A.W Desi. 2009. *Pengaruh Enzim Bromelin dan Waktu Inkubasi Pada Proses Hidrolisi Ikan Lemuru Menjadi Kecap*. Buana Sains Volume 9 No 2.
- Jing Xu, Z. Qingshan , Q. Yanyan , and Y. 2012. Antioxidant activity and anti-exercise-fatigue effect of highly denatured soybean meal hydrolysate prepared using neutrase. *Journal Food Science and Technology*. 52(4): 1982–1992.

- Kanetro, B dan Hastuti S. 2003. *Ragam Olahan Produk Kacang-kacangan*. Yogyakarta: Universitas Wagsa Manggala Press.
- Karioti A, L.D. Hadjipavlou, M.L. Mensah, T.C. Fleischer, dan H. Skaltsa. 2004. Composition and antioxidant activity of the essential oils of *Xylopi aethiopica* (Dun) A. Rich. (*Annonaceae*) leaves, stem bark, root bark, fresh and dried fruits, growing in Ghana. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 8094-8098.
- Kay, D. E. 1979. *Food Legumes*. London: Tropical Product Institute.
- Kim S.J, dan S. Kim. 2007. Purification and characterization of antioxidant peptide from hoki (*Johnius belengerii*) frame protein by gastrointestinal digestion. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 18(1): 31-38.
- Kumar, S. dan A. Pandey. 2013, Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal* 3(7): 1-16.
- Korhonen, H., dan A. Pihlanto. 2006. Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal*. 16: 945-960.
- Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Latifah. A. 2013. Aktivitas antioksidan dan komponen bioaktif hidrolisat protein jeroan ikan Kakap Putih (*Lates calcalifer*). *Skripsi*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Li, B., F. Chen., X. Wang., B. Ji, dan Y. Wu. (2007). Isolation and identification of antioxidative peptides from porcine collagen hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization–mass spectrometry. *Food Chemistry* 102: 1135–1143.
- Li, Y., B. Jiang., T. Zhang., W. Mu., dan J. Liu. (2008). Antioxidant and free radical scavenging activities of chickpea protein hydrolysate (CPH). *Food Chemistry* 106: 444–450.
- Li Y, J. Yu, I. Goktepe, M. Ahmedna. 2016. The potential of papain and alcalase enzyme and process optimizations to reduce allergenic gliadins in wheat flour. *Food Chemistry* 196: 13388- 1345.
- Liaset, B., R. Nortvedt, E. Lied, M. Espe. 2002. Studies on the nitrogen recovery in enzymatic hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) frames by Protamex™ protease. *Process Biochemistry* 37: 1263–1269.

- Liu Z, A. Brady, A. Young, B. Rasimick, K. Chen, C. Zhou dan N.R. Kallenbach. 2007. *Length effects in antimicrobial peptides of the (RW)_n series. Antimicrobial. Agents Chemother.* 51(2): 597-603.
- Luo H., B.Wang., Z. Li., C.F. Chi., Q. Zhang., dan G. He. 2013. Preparation and Evaluation of Antioxidant Peptide from Papain Hydrolysate of *Sphyrna lewini* Muscle Protein. *Journal Food Science Technology.* Vol. 51 (1): 281-288.
- Mundi S, dan R.E. Aluko 2014. Inhibitory properties of kidney bean protein hydrolysate and its membrane fraction against renin, angiotensin converting enzyme, and free radicals. *Austin Journal Nutrition Food Science* 2: 1008.
- Molyneux P. 2004. The use of the stable free radical dyhenylpicrylhydrazil (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Journal of Science and Technology* 26: 211-219.
- Mongelli, E., C. Desmarchelier, A. Giulietti, J. Coussio, G. Ciccia. 1995. Bioactivity of certain medicinal latexes used by the Ese'ejas. *Journal Ethnopharm.* 47: 159-163.
- Ngoh, Y.Y., C.Y. Gan. 2016. Enzyme-assisted extraction and identification of antioxidant and amylase inhibitory peptides from Pinto beans (*Phaseolus vulgaris* cv. Pinto). *Food Chemistry.* 190: 331-337.
- Nurhayati T., Desniar, S. Made. 2013. Pembuatan pepton secara enzimatis menggunakan bahan baku jeroan ikan tongkol. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia* 16 (1): 1-11.
- Nurjanah, A. Abdulla, dan A. Apriand. 2011. Aktivitas antioksidan dan komponen bioaktif pada keong ipong-ipong (*Fasciolaria salmo*). *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia.* XIV(1): 22-29.
- Oyaizu, M. 1986. Studies on products of browning reaction: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition* 44: 307-315.
- Pelletier A. dan J. Sygusch. 1990. Purification and Characterization of Three Chitosanase Activities from *Bacillus megaterium* P1. *Applied and Enviromental Microbiology.* 56 (4): 844-848.
- Pokorny, J., N. Yanishleva, dan M. Gordon. 2001. *Antioxidant in Food.* Emglan: Woodhead Publishing Ltd.
- Pownall TL, C.C. Udenigwe, R.E. Aluko. 2010. Amino acid composition and antioxidant properties of pea seed (*Pisum sativum* L.) enzymatic protein hydrolysate fractions. *Journal Agricultural Food Chemistry* 58: 4712-4718.

- Prastari C.C, S. Yasni, dan M. Nurilmala. 2017. Karakteristik protein ikan gabus yang berpotensi sebagai antihiperlipemik. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 20(2): 413-423.
- Prior R.L., X. Wu., dan K. Schaich. 2005. Standarized Method for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. (53): 4290-4302.
- Purbasari, D. 2008. Produksi dan karakterisasi hidrolisat protein dari kerang mas ngur (*Atactodea striata*). *Skripsi*. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor.
- Purwani I. 2014. *Layanan Perpustakaan*. Yogyakarta : Ombak.
- Ranahtunga S., N. Rajapakse., dan S. K Kim. 2006. Purification and characterization of antioxidative peptide derived from muscle of conger (*Conger myriaster*). *European Food Research and Technology*. Vol. 222 (12): 310-315.
- Rastall, R. 2007. *Novel enzyme technology for food application*. USA: CRC Press.
- Sababelkheir M.K., dan M.M. Fat Hassan. 2012. Amino acid composition of human and animal's milk (camel, cow, sheep and goat). *ARPJ (Asian Research Publishing Network) Journal Science Technology* 2: 32-34.
- Samaranayaka A.G.P dan E.Y.C. Li-Chan. 2011. Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. *Journal of Functional Food* 3: 229-254.
- Sari, M. 2011. Identifikasi Protein Menggunakan Fourier Transform Infrared (FTIR). *SKRIPSI*. 1-84.
- Sharma, O.P., dan T.K. Bhat. 2009. Analytical methods DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry* 113: 1202-1205.
- Shimada K., K. Fujikawa, K. Yahara, dan T. Nakamura. 1992. Antioxidative properties of Xhantan on the antioxidation of soy bean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40: 945-948.
- Soetan, K. O., dan O. E. Oyewole. 2009. The need for adequate processing to reduce the anti-nutritional factors in plants used as human food and animal feeds:a review. *African Journal Food Science* 3(9): 223-232.
- Songyi L., J. Yan, L. Mingyuan, Y. Yang , M. Zhang , Y. Guo , G. Jones, J. Liu, Y. Yin. 2013. Research on the preparation of antioxidant peptides derived

- from egg white with assisting of high-intensity pulsed electric field. *Food Chemistry* 139: 300–306.
- Subagio A., S. Hartanti., W.S. Windrati., Unus, M. Fauzi. dan B. Herry. 2002. Characteristics of protein hydrolysate from tempeh. *Jurnal of Food Technology and Industry* 8: 204-210.
- Subagyo, A. 2003. Pengaruh Penambahan Isolat Protein Koro Pedang (*Canavalia ensiformis* L.) Terhadap Karakteristik Cake. Jember: Universitas Jember. *Jurnal Teknologi dan Industri pangan* Vol. XIV No.2.
- Sudarmadji S., B. Haryono dan E. Suhardi. 1996. *Analisa Bahan Makanan dan Pertanian*. Liberty. Yogyakarta.
- Sudiyono. 2010. Penggunaan Na_2HCO_3 Untuk Mengurangi Kandungan Asam Sianida (HCN) Koro Benguk Pada Pembuatan Koro Benguk Goreng. *Jurnal Agrika*. 4 (1): 48-53.
- Suhartono. 1989. *Enzim dan Bioteknologi*. Bogor: Departemen Pendidikan dan kebudayaan Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Pusat antar Universitas Pangan dan Gizi Institut Pertanian Bogor.
- Sukrosono N. 2006. *Penentuan efisiensi pemisahan sianida pada pengolahan umbi gadong (*Dioscorea hispida*)*. Prosiding (ISSN 1978-0176). Seminar nasional II SDM teknologi nuklir. Yogyakarta, 21-22 Desember 2006.
- Susanti, S. P. 2005. *Karakteristik Enzim Protease dari Getah Tanaman Biduri (*Calotropis gigantea*) hasil ekstraksi menggunakan Amonium Sulfat*. Jember: Fakultas Teknologi Pertanian. Universitas Jember.
- Tejasari. 2005. *Nilai Gizi Pangan*. Graha Ilmu: Yogyakarta.
- Udenigwe C.C and R.E. Aluko 2011. Chemometric analysis of the amino acid requirement of antioxidant food protein hydrolysates. *International Journal Molecular Science* 12: 3148-3161.
- Van der Ven, C. 2002. *Biochemical and Functional Characterisation of Casein and Whey Protein Hydrolysates*. Netherland: Wageningen University.
- Walker J.M. 2002. *The Protein Protocols Handbook*. Second Edition. Humana Press. New Jersey, 3-10.
- Whitaker J.R. 1994. *Principle of Enzymology for The Food Science*. Marcel Decker. New York 29-62.
- Wijaya, S.K.S., dan L. Rohman. 2005. *Fraksinasi dan Karakterisasi protein Utama Biji Kedelai*. Jember: Fakultas MIPA Universitas Jember.

- Winarno, F.G. 1995. *Enzim pangan*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.
- Windrati, W.S., A. Nafi dan P.D. Augustine. 2010. Sifat Nutrisional *Protein Rich Flour* (PRF) Koro Pedang (*Canavalia ensiformis* L.). *Jurnal Agrotek*. 4(1): 18-26.
- Witono Y. 2002a. Isolasi dan Karakterisasi Enzim Protease dari Getah Tanaman Biduri. *Jurnal Teknologi Hasil Pertanian*. 1(1): 1- 14.
- Witono Y. 2002b. Pemanfaatan Enzim Protease dari Tanaman Biduri untuk Pengolahan Makanan. *Jurnal Sains dan Teknologi*. 1(1): 32 - 37.
- Witono Y., W.S. Windrati. and A. Subagio. 2003. Studi Pembuatan Keju Menggunakan Enzim Protease dari Tanaman Biduri (*Calotropis gigantea*). *Prosiding Seminar Nasional Perhimpunan Ahli Teknologi Pangan Indonesia*, Yogyakarta 22-23 Juli 2003.
- Witono Y., A. Subagio., W.S Windrati., Y. Praptiningsih dan Hartanti. 2004. Enzim Protease dari Tanaman Biduri (*Calotropis gigantea*), *Prosiding Seminar Nasional-Perhimpunan Ahli Teknologi Pangan Indonesia (PATPI)*, Jakarta.
- Witono Y., A. Subagio, T. Susanto. dan S.B. Widjanarko., 2006. Telaah Teknik Produksi Enzim Protease dari Tanaman Biduri (*Calotropis gigantea*), *Prosiding Seminar Nasional Perhimpunan Ahli Teknologi Pangan Indonesia*, Yogyakarta.
- Witono, Y., Aulanni'am, A. Subagio., S.B. Widjianarko. 2007a. Purifikasi dan Karakterisasi Parsial Enzim Protease Dari Tanaman Biduri (*Calotropis gigantea*). *Jurnal Teknologi Industri Pangan*. Vol. 18 (1): 1-9.
- Witono, Y., Aulanni'am, A. Subagio., S.B Widjianarko. 2007b. Karakteristik Hidrolisat Protein Kedelai Hasil Hidrolisis Protease dari Tanaman Biduri. *Berkala Penelitian Hayati*. Vol. 3 (1): 7-13.
- Witono, Y. 2008. Preliminary Study For Enzymatic Processing Of Milkfish Hydolisate By Using 'Biduri' Protease. *Jurnal Teknologi Hasil Pertanian*. Sub Tema I: Teknologi Proses Pangan. Jember: Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.
- Witono, Y. 2009. "Spesifitas dan Stabilitas Protease Biduri (*Calotropis gigantea*)". Denpasar: *Prosiding Seminar Nasional Perhimpunan Ahli Teknologi Pangan Indonesia (PATPI)*.
- Witono, Y. and W.W. Kang. 2010. Specific Characteristic of Novel Cystein Protease From Indonesian Biduri Plant (*Calotropis gigantea*). *The Korean Society of Food Science and Technology*.

- Wu, H. C., H.M. Chen, and C.Y. Shiau. 2003. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Research International Journal*. 36, 949–957.
- Xiong, Y.L. 2010. *Antioxidant Peptides in Bioactive Proteins and Peptides as Functional Foods and Nutraceuticals*. Y. Mine, E. Li-Chan and B. Jiang, Eds., Blackwell Publishing Limited. Institute of Food Technologists.
- Xu, X., R. Fan, R. Zheng, C. Li, and D. Yu. 2012. Proteomic Analysis of Seed Germination under Salt Stress in Soybeans. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine and Biotechnology)*: 507-517.
- Yamaguchi T, H. Takamura, T. Matoba, and J. Terao. 1998. HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using *1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*. *Bioscience Biotechnology Biochemistry* 62: 1201-1204.
- Yuhernita and Juniarti. 2011. *Analisis Senyawa Metabolit Sekunder dari Ekstrak Metanol Daun yang Berpotensi Sebagai Antioksidan*. Makara Sains Departemen Biokimia. Fakultas Kedokteran Universitas Yarsi: Jakarta. Halaman 48-52.
- Zarei M., A. Ebrahimpour, A. Abdul-Hamid, F. Anwar, and N. Saari. 2012. Production of defatted palm kernel cake protein hydrolysate as a valuable source of natural antioxidants. *International Journal Molecular Science* 13: 8097-8111.
- Zhu, K., H. Zhou, and H. Qian. 2006. Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. *Process Biochemistry* 41(6): 1296-1302.

LAMPIRAN A. DATA HASIL ANALISIS

A.1 Data Kadar Protein Hidrolisat PRF Koro Pedang (AOAC, 2005)

Tabel A.1.1 Data Kadar Protein Hidrolisat PRF Koro Pedang

Sampel	U1	U2	U3	Jumlah	Rata-rata	STDEV
A1B1	39,183	39,533	38,484	39,067	39,067	0,534
A1B2	40,758	41,107	40,233	40,699	40,699	0,440
A1B3	41,982	43,032	43,206	42,740	42,740	0,662
A2B1	49,504	50,903	50,728	50,378	50,378	0,762
A2B2	55,276	54,402	55,976	55,218	55,218	0,789
A2B3	59,475	60,524	59,824	59,941	59,941	0,534
A3B1	62,973	64,897	64,198	64,023	64,023	0,974
A3B2	66,072	65,422	65,422	65,597	65,597	0,631
A3B3	71,719	69,970	69,620	70,436	70,436	1,125

Tabel A.1.2 Data ANOVA Interaksi Lama Hidrolisis dan Konsentrasi Enzim pada Kadar Protein Hidrolisat PRF Koro Pedang

Source	Type III Sum of Square	Df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	3243,609(a)	8	803,560	44,681	,000
Intercept	79413,653	1	79413,653	44341,945	,000
Lama hidrolisis	,000	0	-	-	-
Kon.Enzim	,000	0	-	-	-
HE	29,367	4	7,342	13,171	,000
Error	10,033	18	,557		
Total	82667,295	27			
Corrected Total	3253,642	26			

a R Square = ,997 (Adjusted R Square= ,996)

Tabel A.1.3 Data Uji ANOVA Kadar Protein Hidrolisat PRF Koro Pedang

Source	Type III Sum of Square	Df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	3214,241(a)	4	803,560	44,681	,000
Intercept	79413,653	1	79413,653	44341,945	,000
Lama hidrolisis	3019,079	2	1509,539	842,877	,000
Kon.Enzim	195,163	2	97,581	54,486	,000
Error	39,401	22	1,791		
Total	82667,295	27			
Corrected Total	3253,642	26			

Tabel A.1.4 Data DMRT Kadar Protein Hidrolisat PRF Koro Pedang

Perlakuan	n	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Notasi
A1B1	3	39,06									A
A1B2	3		40,69								B
A1B3	3			42,74							C
A2B1	3				50,37						D
A2B2	3					55,21					E
A2B3	3						59,94				F
A3B1	3							64,02			G
A3B2	3								65,59		H
A3B3	3									70,43	I
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	

Means for group in homogenous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square (Error) = ,577

A. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

B. Alpha = ,05

A.2 Data Derajat Hidrolisis (Hasnaliza *et al.*, 2010)

Tabel A.2.1 Data Derajat Hidrolisat PRF Koro Pedang

Sampel	U1	U2	U3	Jumlah	Rata-rata	STDEV
A1B1	8,929	8,628	9,545	27,102	9,034	0,467
A1B2	11,159	11,277	10,870	33,306	11,102	0,209
A1B3	11,667	11,992	11,943	35,602	11,867	0,175
A2B1	17,420	17,096	17,241	51,757	17,252	0,162
A2B2	16,772	17,685	17,500	51,957	17,319	0,483
A2B3	17,941	18,064	19,006	55,011	18,337	0,583
A3B1	22,222	21,429	20,436	64,087	21,362	0,895
A3B2	25,066	25,538	27,406	78,010	26,003	1,237
A3B3	30,488	30,625	30,151	91,264	30,421	0,244

Tabel A.2.2 Data ANOVA Interaksi Lama Hidrolisis dan Konsentrasi Enzim pada Derajat Hidrolisis Hidrolisat PRF Koro Pedang

<i>Source</i>	<i>Type III Sum of Square</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F</i>	<i>Sig.</i>
<i>Corrected Model</i>	1188,934(a)	8	148,617	407,370	,000
<i>Intercept</i>	8823,619	1	8823,619	24186,206	,000
Lama hidrolisis	,000	0	-	-	-
Kon.Enzim			-	-	-
HE	53,974	4	13,494	36,987	,000
<i>Error</i>	6,567	18	,365		
<i>Total</i>	10019,120	27			
<i>Corrected Total</i>	1195,501	26			

a *R Square* = ,995 (*Adjusted R Square*= ,992)

Tabel A.2.3 Data ANOVA Derajat Hidrolisis Hidrolisat PRF Koro Pedang

<i>Source</i>	<i>Type III Sum of Square</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F</i>	<i>Sig.</i>
<i>Corrected Model</i>	1134,960(a)	4	283,740	103,108	,000
<i>Intercept</i>	8823,619	1	8823,619	3206,415	,000
Lama hidrolisis	1050,704	2	525,352	190,908	,000
Kon.Enzim	84,256	2	42,128	15,309	,000
<i>Error</i>	60,541	22	2,752		
<i>Total</i>	10019,120	27			
<i>Corrected Total</i>	1195,501	26			

a *R Square* = ,949 (*Adjusted R Square*= ,940)

Tabel A.2.4 Data DMRT Derajat Hidrolisis Hidrolisat PRF Koro Pedang

Perlakuan	N	1	2	3	4	5	6	Notasi
A1B1	3	9,0340						A
A1B2	3		11,1020					B
A1B3	3		11,8673					B
A2B1	3			17,2523				C
A2B2	3			17,3190				C
A2B3	3			18,3370				C
A3B1	3				21,3623			D
A3B2	3					26,0033		E
A3B3	3						30,4213	F
Sig.		1,000	,138	,050	1,000	1,000	1,000	

Means for group in homogenous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

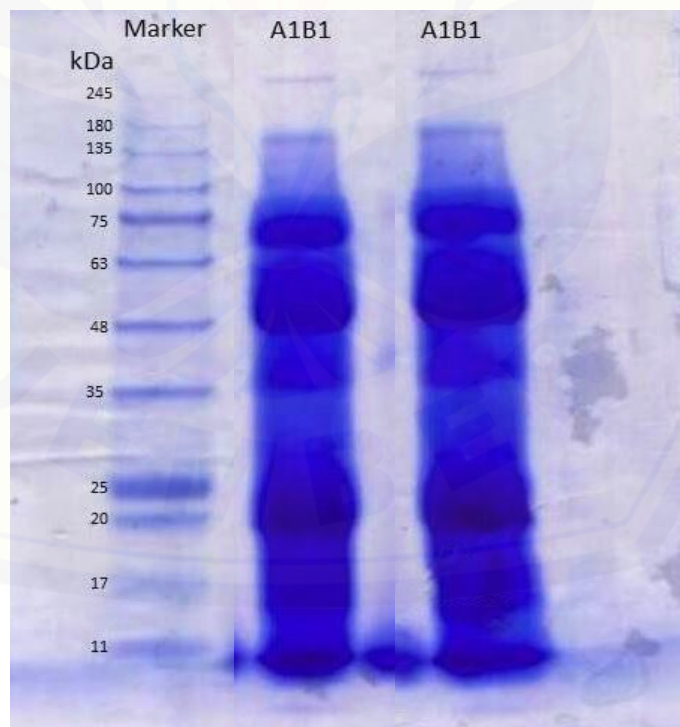
The error term is Mean Square (Error) = ,365

A. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

B. Alpha = ,05

A.3 Berat Molekul (Laemlli, 1970)

A.3.1 Data Elektroforesis SDS-PAGE pada Hidrolisat PRF Koro Pedang



Keterangan : M = Marker

A1B1 = Hidrolisat PRF Koro Pedang

Tabel. A.3.2 Data Log BM

Protein Marker	BM (kDa)	Jarak tracking (cm)	Log (BM)	RF
I	245	0,1	2,389	0,009
II	180	1	2,255	0,091
III	135	1,3	2,130	0,118
IV	100	2,2	2	0,200
V	75	2,6	1,875	0,236
VI	63	3,5	1,799	0,318
VII	48	4,7	1,681	0,427
VIII	35	6	1,544	0,545
IX	25	7,7	1,397	0,700
X	20	8,2	1,301	0,745
XI	17	9,4	1,230	0,855
XII	11	10,6	1,041	0,964

Panjang separating gel = 11 cm

A. RF Marker

1. $RF1 = \frac{\text{panjang pita 1}}{\text{panjang separating gel}} = \frac{0,1}{11} = 0,009$
2. $RF1 = \frac{\text{panjang pita 1}}{\text{panjang separating gel}} = \frac{1}{11} = 0,091$
3. $RF1 = \frac{\text{panjang pita 1}}{\text{panjang separating gel}} = \frac{1,3}{11} = 0,118$
4. $RF1 = \frac{\text{panjang pita 1}}{\text{panjang separating gel}} = \frac{2,2}{11} = 0,200$
5. $RF1 = \frac{\text{panjang pita 1}}{\text{panjang separating gel}} = \frac{2,6}{11} = 0,236$
6. $RF1 = \frac{\text{panjang pita 1}}{\text{panjang separating gel}} = \frac{3,5}{11} = 0,318$
7. $RF1 = \frac{\text{panjang pita 1}}{\text{panjang separating gel}} = \frac{4,7}{11} = 0,427$
8. $RF1 = \frac{\text{panjang pita 1}}{\text{panjang separating gel}} = \frac{6}{11} = 0,545$
9. $RF1 = \frac{\text{panjang pita 1}}{\text{panjang separating gel}} = \frac{7,7}{11} = 0,700$
10. $RF1 = \frac{\text{panjang pita 1}}{\text{panjang separating gel}} = \frac{8,2}{11} = 0,745$
11. $RF1 = \frac{\text{panjang pita 1}}{\text{panjang separating gel}} = \frac{9,4}{11} = 0,855$
12. $RF1 = \frac{\text{panjang pita 1}}{\text{panjang separating gel}} = \frac{10,6}{11} = 0,96$

B. RF Sampel

$$1. \text{RF1} = \frac{\text{panjang pita 1}}{\text{panjang separating gel}} = \frac{8,5}{11} = 0,772$$

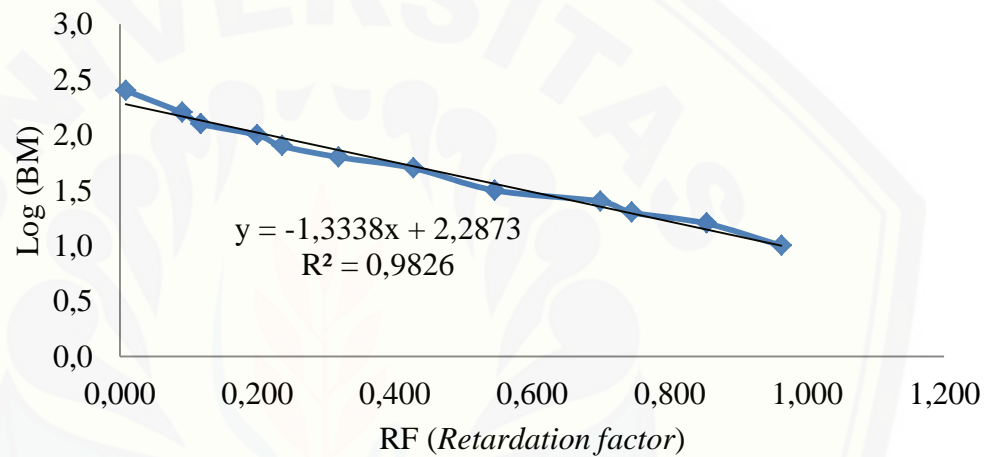
$$2. \text{RF1} = \frac{\text{panjang pita 1}}{\text{panjang separating gel}} = \frac{6,5}{11} = 0,590$$

$$3. \text{RF1} = \frac{\text{panjang pita 1}}{\text{panjang separating gel}} = \frac{5,5}{11} = 0,5$$

$$4. \text{RF1} = \frac{\text{panjang pita 1}}{\text{panjang separating gel}} = \frac{3}{11} = 0,272$$

$$5. \text{RF1} = \frac{\text{panjang pita 1}}{\text{panjang separating gel}} = \frac{1,5}{11} = 0,136$$

C. Kurva Log BM



Perhitungan berat molekul hidrolisat PRF koro pedang

$$1. \text{RF (sampel)} = x$$

$$y = -1,3338x + 2,2873$$

$$y = -1,3338 (0,772) + 2,2873$$

$$y = 1,257$$

$$y = \log \text{BM}$$

$$\text{BM} = \text{anti log } y$$

$$\text{BM} = \text{anti log } 1,257$$

$$\text{BM} = 18,07 \text{ kDa}$$

$$2. \text{RF (sampel)} = x$$

$$y = -1,3338x + 2,2873$$

$$y = -1,3338 (0,590) + 2,2873$$

$$y = 1,500$$

$$y = \log \text{ BM}$$

$$\text{BM} = \text{anti log } y$$

$$\text{BM} = \text{anti log } 1,500$$

$$\text{BM} = 31,62 \text{ kDa}$$

3. RF (sampel) = x

$$y = -1,3338x + 2,2873$$

$$y = -1,3338 (0,5) + 2,2873$$

$$y = 1,620$$

$$y = \log \text{ BM}$$

$$\text{BM} = \text{anti log } y$$

$$\text{BM} = \text{anti log } 1,620$$

$$\text{BM} = 41,68 \text{ kDa}$$

4. RF (sampel) = x

$$y = -1,3338x + 2,2873$$

$$y = -1,3338 (0,272) + 2,2873$$

$$y = 1,924$$

$$y = \log \text{ BM}$$

$$\text{BM} = \text{anti log } y$$

$$\text{BM} = \text{anti log } 1,924$$

$$\text{BM} = 83,94 \text{ kDa}$$

5. RF (sampel) = x

$$y = -1,3338x + 2,2873$$

$$y = -1,3338 (0,136) + 2,2873$$

$$y = 2,105$$

$$y = \log \text{ BM}$$

$$\text{BM} = \text{anti log } y$$

$$\text{BM} = \text{anti log } 2,105$$

$$\text{BM} = 127,35 \text{ kDa}$$

A.4 Data Analisis Komposisi Asam Amino

Tabel A.4.1 Komposisi Asam Amino Hidrolisat PRF Koro Pedang

No	Parameter	Result	Unit	Method
1	Aspartic acid	9,00	% w/w	IK.LP-04.7-LT-1.0 (HPLC)
2	Glutamic acid	11,05	% w/w	IK.LP-04.7-LT-1.0 (HPLC)
3	Serine	4,53	% w/w	IK.LP-04.7-LT-1.0 (HPLC)
4	Histidine	1,89	% w/w	IK.LP-04.7-LT-1.0 (HPLC)
5	Glycine	2,88	% w/w	IK.LP-04.7-LT-1.0 (HPLC)
6	Threonine	3,79	% w/w	IK.LP-04.7-LT-1.0 (HPLC)
7	Arginine	4,86	% w/w	IK.LP-04.7-LT-1.0 (HPLC)
8	Alanine	3,19	% w/w	IK.LP-04.7-LT-1.0 (HPLC)
9	Tyrosine	3,08	% w/w	IK.LP-04.7-LT-1.0 (HPLC)
10	Methionine	0,87	% w/w	IK.LP-04.7-LT-1.0 (HPLC)
11	Valine	3,91	% w/w	IK.LP-04.7-LT-1.0 (HPLC)
12	Phenylalanine	3,58	% w/w	IK.LP-04.7-LT-1.0 (HPLC)
13	I-leucine	3,48	% w/w	IK.LP-04.7-LT-1.0 (HPLC)
14	Leucine	6,91	% w/w	IK.LP-04.7-LT-1.0 (HPLC)
15	Lysine	4,68	% w/w	IK.LP-04.7-LT-1.0 (HPLC)
	Amino Acid total	67,69	% w/w	IK.LP-04.7-LT-1.0 (HPLC)

A.5 Data Aktivitas Antioksidan Metode DPPH (Shimada *et al.*, 1992)

Tabel A.5.1 Data Aktivitas Antioksidan (%RSA) Hidrolisat PRF Koro Pedang

Sampel	Blanko	U1	Blanko	U2	Blanko	U3	Jumlah	STDEV
A1B1	0,453	6,328	0,445	5,169	0,447	6,078	17,574	0,610
A1B2	0,453	9,468	0,445	8,390	0,447	8,650	26,508	0,563
A1B3	0,453	10,522	0,445	10,237	0,447	10,664	31,423	0,217
A2B1	0,453	11,626	0,445	12,934	0,447	13,050	37,610	0,791
A2B2	0,453	13,662	0,445	12,784	0,447	12,491	38,937	0,609
A2B3	0,453	13,319	0,445	14,607	0,447	13,149	41,075	0,797
A3B1	0,453	14,165	0,445	12,285	0,447	13,870	40,320	1,011
A3B2	0,453	13,944	0,445	13,059	0,447	15,287	42,290	1,122
A3B3	0,453	14,349	0,445	14,981	0,447	14,914	44,244	0,347

Tabel A.5.2 Data ANOVA Interaksi Lama Hidrolisis dan Konsentrasi Enzim pada Aktivitas Antioksidan Hidrolisat PRF Koro Pedang

<i>Source</i>	<i>Type III Sum of Square</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F</i>	<i>Sig.</i>
<i>Corrected Model</i>	170,568 (a)	4	41,839	19,945	,000
<i>Intercept</i>	3792,166	1	3792,166	1807,741	,000
Lama hidrolisis	,000	0	-	-	-
Kon.Enzim	,000	0	-	-	-
HE	3,214	4	,804	,337	,850
<i>Error</i>	42,936	18	2,385		
<i>Total</i>	4005,670	27			
<i>Corrected Total</i>	213,504	26			

a R Square = ,799 (Adjusted R Square= ,710)

Tabel A.5.3 Data ANOVA Aktivitas Antioksidan Hidrolisat PRF Koro Pedang

<i>Source</i>	<i>Type III Sum of Square</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F</i>	<i>Sig.</i>
<i>Corrected Model</i>	167,354 (a)	4	41,839	19,945	,000
<i>Intercept</i>	3792,166	1	3792,166	1807,741	,000
Lama hidrolisis	,850	2	,425	,203	,818
Kon.Enzim	166,504	2	83,252	39,687	,000
<i>Error</i>	46,150	22	2,098		
<i>Total</i>	4005,670	27			
<i>Corrected Total</i>	213,504	26			

a R Square = ,784 (Adjusted R Square= ,745)

Tabel A.5.4 Data Uji DMRT Aktivitas Antioksidan Hidrolisat PRF Koro Pedang

Perlakuan	N	1	2	Notasi
A2B1	3	7,9320		A
A3B1	3	8,4640		A
A1B1	3	8,7727		A
A1B2	3		12,8690	B
A3B2	3		12,8967	B
A2B2	3		13,4417	B
A2B3	3		13,4417	B
A1B3	3		14,1527	B
A3B3	3		14,6903	B
Sig.			,215	

Means for group in homogenous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

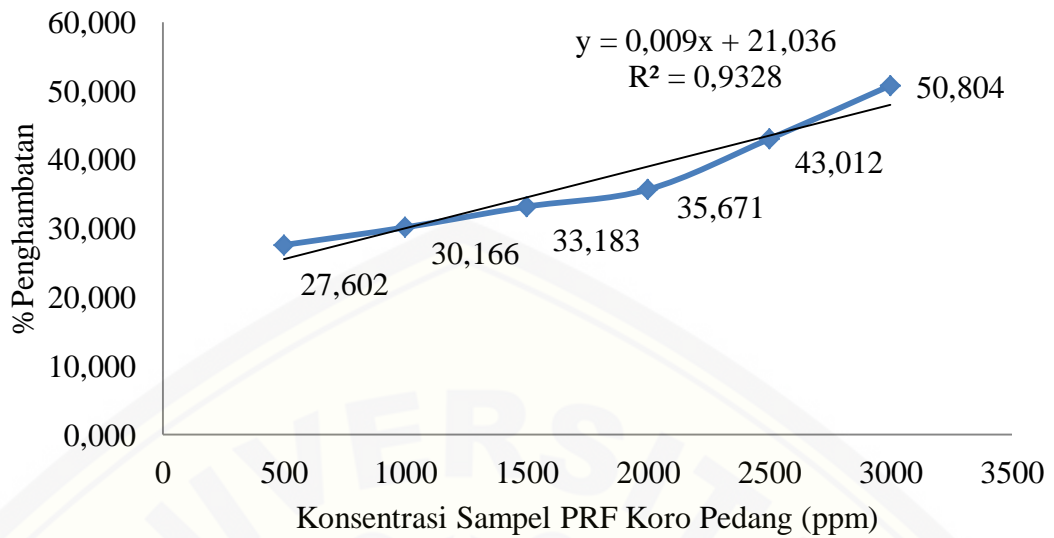
The error term is Mean Square (Error) = 2,385

- Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000*
- Alpha = ,05*

A.6 Data IC₅₀ pada Hidrolisat PRF Koro Pedang

Tabel A.6.1 Data IC₅₀ Hidrolisat PRF Koro Pedang Konsentrasi Sampel A3B3 (3%; 3 jam)

Sampel	U1	Absorbansi λ 517 nm			Rata-rata	Blanko	% Inhibisi
		U2	U3				
3000 ppm	0,214	0,221	0,218	0,217	0,442	50,804	
2500 ppm	0,264	0,235	0,257	0,252	0,442	43,012	
2000 ppm	0,280	0,258	0,315	0,284	0,442	35,671	
1500 ppm	0,285	0,274	0,327	0,295	0,442	33,183	
1000 ppm	0,302	0,292	0,332	0,309	0,442	30,166	
500 ppm	0,309	0,302	0,350	0,320	0,442	27,602	



Nilai IC₅₀ Hidrolisat PRF Koro Pedang

$$y = 0,009x + 21,036$$

$$50 = 0,009x + 21,036$$

$$50 - 21,036 = 0,009x$$

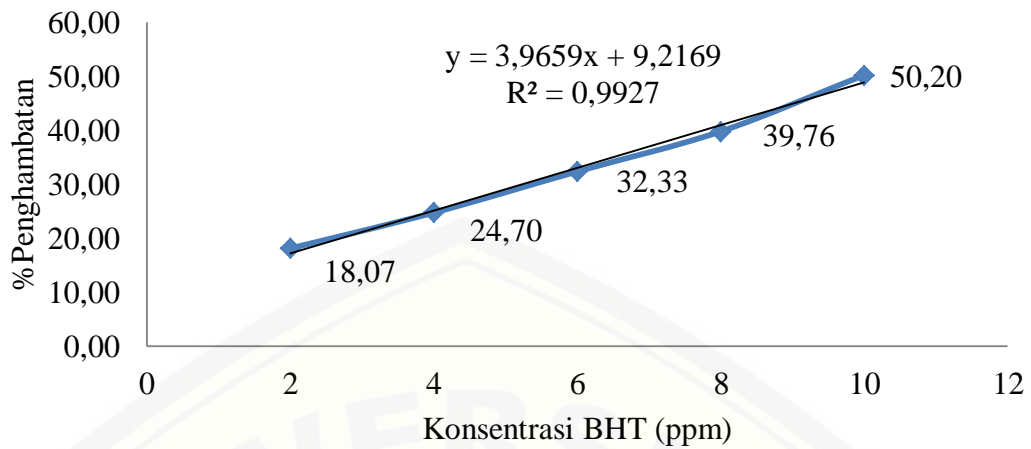
$$28,964 = 0,009x$$

$$X = 3218,22 \text{ ppm}$$

Nilai IC₅₀ untuk hidrolisat PRF Koro Pedang adalah 3218,22 ppm

Tabel A.6.2 Kurva Standar BHT (*Butylated hydroxytoluene*)

Konsentrasi	Absorbansi λ 517 nm			Rata-rata	%Inhibisi
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3		
0	0,498	0,498	0,498	0,498	
2 ppm	0,409	0,408	0,407	0,408	18,072
4 ppm	0,376	0,375	0,374	0,375	24,699
6 ppm	0,337	0,337	0,337	0,337	32,329
8 ppm	0,301	0,300	0,299	0,300	39,759
10 ppm	0,249	0,248	0,247	0,248	50,201



Nilai IC_{50} BHT

$$y = 3,9659x + 9,2169$$

$$50 = 3,9659x + 9,2169$$

$$49,7831 = 3,9659x$$

$$x = 10,282 \text{ ppm}$$

Nilai IC_{50} untuk BHT adalah 10,282 ppm

A.7 Data Aktivitas Antioksidan Hidrolisat PRF Koro Pedang Metode *Reducing Power* (Oyaizu, 1986)

Tabel A.7.1 Data Aktivitas Antioksidan Hidrolisat PRF Metode *Reducing Power*

Sampel	Absorbansi λ 700nm			Jumlah	STDEV
	U1	U2	U3		
Blanko	0,126	0,123	0,122	0,371	0,002
A1B1	0,180	0,181	0,182	0,542	0,001
A1B2	0,183	0,182	0,187	0,553	0,003
A1B3	0,183	0,184	0,192	0,559	0,005
A2B1	0,209	0,197	0,207	0,614	0,006
A2B2	0,224	0,205	0,213	0,643	0,009
A2B3	0,226	0,208	0,220	0,654	0,009
A3B1	0,207	0,191	0,205	0,603	0,008
A3B2	0,219	0,200	0,208	0,628	0,010
A3B3	0,230	0,220	0,218	0,668	0,006

Tabel A.7.2 Data ANOVA Interaksi Lama Hidrolisis dan Konsentrasi Enzim pada *Reducing Power* Hidrolisat PRF Koro Pedang

Source	Type III Sum of Square	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	,005(a)	8	,001	10,311	,000
Intercept	1,105	1	1,105	16839,368	,000
Lama hidrolisis	,000	0	-	-	-
Kon.Enzim	,000	0	-	-	-
HE	,000	4	7,24E-005	1,103	,385
Error	,001	18	6,56E-0,05		
Total	1,111	27			
Corrected Total	,007	26			

a R Square = ,821(Adjusted R Square= ,741)

Tabel A.7.3 Data ANOVA Hidrolisat PRF Koro Pedang Metode *Reducing Power*

Source	Type III Sum of Square	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	,005(a)	4	,001	19,158	,000
Intercept	1,105	1	1,105	16528,832	,000
Lama hidrolisis	,001	2	,000	3,765	,039
Kon.Enzim	,005	2	,002	34,552	,000
Error	,001	22	6,68E-0,05		
Total	1,111	27			
Corrected Total	,007	26			

a R Square = ,777(Adjusted R Square= ,736)

Tabel A.7.3 Hasil Uji Lanjut DMRT Metode *Reducing Power* PRF Koro Pedang

Perlakuan	N	1	2	3	4	Notasi
A1B1	3	,1820				A
A2B1	3	,1823				A
A3B1	3	,1870				A
A1B2	3		,2033			B
A1B3	3		,2037	,2037		BC
A2B2	3		,2103	,2103	,2103	BCD
A2B3	3		,2133	,2133	,2133	BCD
A3B2	3			,2187	,2187	CD
A3B3	3				,2197	D
Sig.		,484	,181	,050	,211	

Means for group in homogenous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

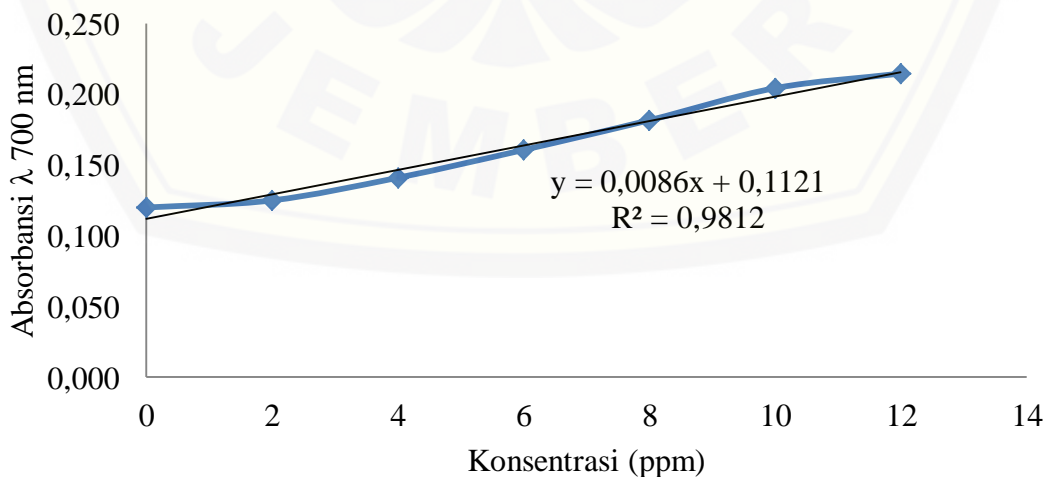
The error term is Mean Square (Error)= 6,56E-0,05

A. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

B. Alpha = ,05

Tabel A.7.4 Kurva Standart *Reducing Power* (Asam Askorbat)

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi λ 700nm			Rata-rata
	U1	U2	U3	
0	0,12	0,12	0,12	0,120
2	0,125	0,125	0,125	0,125
4	0,14	0,141	0,142	0,141
6	0,16	0,162	0,16	0,161
8	0,182	0,182	0,181	0,182
10	0,204	0,204	0,205	0,204
12	0,215	0,214	0,215	0,215



LAMPIRAN B. PEMBUATAN BAHAN KIMIA

B.1 Analisis Derajat Hidrolisis (Hasnaliza *et al.*, 2010) dan Kadar Protein

1. Asam Borat 4%

Larutan asam askorbat 4% dilakukan dengan cara melarutkan 4 gram asam borat ke dalam akuades pada labu takar 100 ml, agar larutan lebih tercampur rata maka pencampuran larutan dibantu dengan alat stirer.

2. Larutan TCA 20%

Larutan TCA 20% dibuat dengan cara melarutkan 20 gram TCA ke dalam akuades dengan ditera pada labu ukur 100 ml. Penambahan tersebut hingga batas tera labu ukur.

3. Larutan NaOH 40%

Larutan NaOH 40% dilakukan dengan cara melarutkan NaOH sebanyak 40 gram kemudian dilakukan penambahan akuades di dalam labu takar hingga volume mencapai 100 ml atau batas tera.

4. Larutan HCl 0,1 N

Larutan HCl 0,1 N dilakukan dengan cara melarutkan 0,83 ml HCl kemudian ditera dengan akuades dalam labu takar 100 ml. HCL termasuk ke dalam asam kuat maka dari itu peneraan serta pengambilan HCL perlu dilakuakn diruang asam sehingga tidak mengganggu pernafasan

B.2 Bahan Kimia pada Analisa Berat Molekul Protein SDS-PAGE (Laemili, 1970)

1. Reagen Bradford

Commasive Blue sebanyak 0,01gram dilakukan pelarutan dalam 5 ml etanol 95% ditambah asam fosfor 85% sebanyak 10 ml, kemudian dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring. Saat hendak akan digunakan maka harus dilakukan pengenceran sebanyak lima kali (Bradford, 1976).

2. *Buffer Loading*

a. Tris-Cl 0,5 M pH 6,8

Pembuatan larutan Tris-Cl 0,5 M pH 6,8 dilakukan dengan melarutkan 6 gram basa tris dalam 60 ml air deionisasi dan dilakukan pengadukan.

Kondisi pH harus disesuaikan yaitu dengan pH 6,8 dengan menambahkan HCL 6 N, dan dilakukan penneraan hingga volume 100 ml.

b. SDS 10% (w/v)

SDS (*Sodium Dodecyl Sulphate*) 10% dibuat dengan cara melarutkan 10 gram SDS dalam 90 ml air deionisasi, kemudian dilakukan pengadukan dan dilakukan penneraan volume hingga 100 ml pada labu takar hingga tanda batas.

c. Glycerol 10%

Larutan Glycerol 10% dilakukan dengan cara melarutkan 10 ml Gliserol dengan akuades dalam labu takar 100 ml hingga tanda batas labu ukur.

d. Bromophenol blue

Indikator *Bromophenol blue* diawali dengan melarutkan *Bromophenol blue* sebanyak 0,1 gram dalam campuran 5 ml etanol 95% dan 3 ml NaOH 0,05 N, kemudian diencerkan dengan air destilasi sampai volume 250 ml.

3. Acrylamide 15%

Pembuatan acrylamide 15% dilakukan dengan melarutkan 14,5 gram acrylamide dan 0,25 gram N[']N[']- *bis-methylene-acrylamide* ke dalam air deionisasi hingga volume mencapai 100 ml. Larutan dilakukan penghomogenan dengan menggunakan stirer dan dilakukan penyaringan dan disimpan pada suhu 40⁰C di tempat yang terhindar dari cahaya. Larutan dapat disimpan maksimal 30 hari sebelum digunakan.

4. Buffer Elektroda

a. Glycine 192 mM

Larutan Glycine 192 mM dilakukan dengan cara melarutkan 1,44 gram Glycine dengan akuades dalam labu takar 100 ml hingga batas labu ukur.

b. Trisbase 25 mM

Larutan basa tris 25 mM dilakuakn dengan cara melarutkan 0,3 gram Tris dengan akuades dalam labu takar 100 ml hingga bats tera.

c. SDS 0,1 %

SDS (*Sodium Dodecyl Sulphate*) 0,1 % dilakukan dengan cara melarutkan 0,1 gram SDS dalam 90 ml air deionisasi lalu dilakukan pengadukan dan setelah homogen ditera hingga volume 100 ml pada labu takar.

5. Buffer Ekstraksi

a. EDTA 1 mM ($C_{10}H_{16}N_2O_8$)

Pembuatan larutan EDTA 1 mM dilakukan dengan cara melarutkan 0,037gram EDTA menggunakan akuades di dalam labu takar 100 ml kemudian dilakukan peneraan hingga batas tera labu ukur.

b. MgCl 10 mM

Pembuatan larutan MgCl 10 mM dilakukan dengan cara melarutkan 0,095 gram MgCl menggunakan akuades dalam labu takar 100 ml hingga batas tera labu ukur.

c. PMSF 1 mM (*Phenyl Methyl Sulfonyl Flouride*)

Pembuatan larutan PMSF 1 mM dilakukan dengan cara melarutkan 0,017 gram PMSF dengan menggunakan akuades di dalam labu takar 100 ml hingga batas tera.

B.3 Analisis Komposisi Asam Amino menggunakan HPLC (AOAC, 2005)

1. HCL 6 N

Larutan HCL 6 N dilakukan dengan cara melarutkan 49,75 ml HCL menggunakan akuades dan dengan dilakukan dalam labu takar 100 ml hingga mencapai batas tera. HCL termasuk kedalam asam kuat maka dari itu pengambilan dan pengenceran HCL harus dilakukan diruang asam, hal ini dikarenakan HCL tidak baik jika terhirup di udara bagi pernafasan.

2. HCL 0,01 N

Larutan HCL 0,01 N dilakukan dengan cara melarutkan 0,083 ml HCL dalam labu takar 100 ml dengan akuades hingga batas tera labu takar. Peneraan dan pengenceran dilakukan di ruang asam.

3. Ortoftalaldehida (OPA)

Pembuatan pereaksi Ortoftalaldehida (OPA) dilakukan dengan cara melarutkan 50 g OPA dalam 4 ml metanol dan dilakukan penambahan

merkaptotanol. Setelah larutan dibuat dilakukan pencampuran secara manual agar homogen kemudian ditambahkan larutan brij-30 dan buffer borat pH 10,4. Larutan yang telah dibuat disimpan pada botol gelap dengan suhu penyimpanan 4⁰ C selama 2 minggu agar larutan stabil. Pereaksi derivatisasi yang akan digunakan lebih baik dalam bentuk *fresh* atau dibuat setiap hari jika ingin menggunakan, dengan cara mencampurkan satu bagian larutan stok dengan dua bagian buffer kalium borat pH 10,4.

4. Fase gerak

Buffer A terdiri dari Na-asetat, Na EDTA, THF (Tetrahidrofur) yang dilarutkan dalam 1 liter air Hi Pure (H.P) kemudian buffer dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring milipori 0,5 mikron yang stabil selama 5 hari pada suhu kamar. Buffer B terdiri dari metanol 95% dalam air Hi Pure dan dalam pembuatannya disaring dengan kertas saring milipori 0,45 mikron.

B.4 Analisis Aktivitas Antioksidan Metode DPPH (Shimada *et al.*, 1992)

1. Larutan DPPH 0,1 mM

Pembuatan larutan DPPH 0,1 mM dilakukan dengan cara melarutkan 0,00197 gram DPPH dengan menggunakan etanol p.a dalam labu takar 50 ml hingga batas labu ukur.

2. Kurva Standar BHT

Pembuatan kurva standar BHT diawali dengan pembuatan larutan induk yaitu larutan BHT 2000 ppm. Sebanyak 20 mg BHT dilarutkan dengan etanol p.a dalam labu takar 10 ml hingga batas tera. Kemudian larutan induk dilakukan pengambilan sesuai volume perhitungan di bawah ini lalu ditambahkan etanol p.a ke dalam labu tera 10 ml, penambahan etanol p.a hingga pada batas tera labu ukur.

a. Larutan BHT 2 ppm

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$2000 \text{ ppm} \times V_1 = 2 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}$$

$$V_1 = (2 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}) / 2000 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 20 \text{ ml} / 2000$$

$$V_1 = 0,01 \text{ ml}$$

- b. Larutan BHT 4 ppm

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$2000 \text{ ppm} \times V_1 = 4 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}$$

$$V_1 = (4 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}) / 2000 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 40 \text{ ml}/2000$$

$$V_1 = 0,02 \text{ ml}$$

- c. Larutan BHT 6 ppm

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$2000 \text{ ppm} \times V_1 = 6 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}$$

$$V_1 = (6 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}) / 2000 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 60 \text{ ml}/2000$$

$$V_1 = 0,03 \text{ ml}$$

- d. Larutan BHT 8 ppm

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$2000 \text{ ppm} \times V_1 = 8 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}$$

$$V_1 = (8 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}) / 2000 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 80 \text{ ml}/2000$$

$$V_1 = 0,04 \text{ ml}$$

- e. Larutan BHT 10 ppm

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$2000 \text{ ppm} \times V_1 = 10 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}$$

$$V_1 = (10 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}) / 2000 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 100 \text{ ml}/2000$$

$$V_1 = 0,05 \text{ ml}$$

B.5 Analisis Aktivitas Antioksidan Metode *Reducing Power* (Oyaizu, 1986)

1. Buffer Phosphat 0,2 M pH 6,6

Larutan buffer phosphat 0,2 M pH 6,6 dibuat dengan cara melarutkan terlebih dahulu 2,78 gram NaH_2PO_4 dengan akuades di dalam labu takar 100 ml hingga batas labu ukur, larutan ini dianggap sebagai larutan X. Selanjutnya

dilakukan pembuatan larutan Y yaitu dengan melarutkan 5,265 gram Na_2HPO_4 dengan menggunakan di labu takar 100 ml hingga batas tera. Larutan X yang telah dibuat dilakukan pengambilan menggunakan gelas ukur 100 ml sebanyak 62,5 ml dan pada larutan Y dilakukan pengambilan 37,5 ml. Larutan X dan larutan Y dicampurkan dan dihomogenkan manual dan dilakukan penambahan akuades hingga volume mencapai volume 200 ml.

2. Larutan TCA 10%

Larutan TCA 10% dibuat dengan cara melarutkan 10 gram TCA kemudian ditambahkan akuades pada labu takar 100 ml, penambahan akuades hingga batas tera labu ukur.

3. *Potassium ferricyanide* 1% ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$)









Larutan *potassium ferricyanide* 1% dilakukan dengan melarutkan 1 gram $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ dengan akuades dalam labu takar 100 ml hingga batas tera labu ukur.

4. Larutan FeCl_3 0,1%

Larutan FeCl_3 0,1% dilakukan dengan melarutkan 0,01 gram dalam 10 ml dengan akuades didalam labu takar hingga batas tera.

LAMPIRAN C. DOKUMENTASI

C1. Tahap produksi hidrolisat PRF (*Protein Rich Flour*) Koro Pedang

 <p>Perendaman koro pedang (<i>Canavalia ensiformis</i>) selama 3 hari dalam suhu kamar (72 jam)</p>	 <p>Ekstraksi dengan menggunakan akuades dan perbandingan 1:5 (KP: akuades)</p>
 <p>Penambahan basa (NaOH) hingga pH 9</p>	 <p>Pengendapan protein pada titik isoelektrik (ph 4,5) selama 24 jam suhu ruang</p>
 <p>Sentrifugasi 3500 rpm selama 15 menit</p>	 <p>Pengeringan (oven ,T=50⁰ C,20 jam)</p>
 <p>Hidrolisat PRF suhu 55⁰ C</p>	 <p>Pengeringan dengan <i>Freeze dryer</i> ±48 jam, -50⁰C</p>

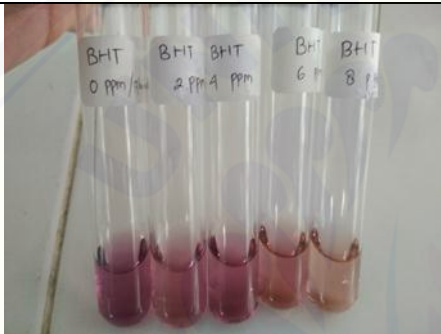
C.2 Tahap Analisis Hidrolisat PRF Koro Pedang



Larutan DPPH 0,1 mM



Pengujian Aktivitas Antioksidan IC₅₀



Pengujian Aktivitas Antioksidan BHT



Pengujian Aktivitas Antioksidan *Reducing Power*



Analisa kadar protein dan derajat hidrolisis



Larutan seri pengujian *reducing power*