



**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN HIDROLISAT PROTEIN
IKAN AIR LAUT DAN IKAN AIR TAWAR**

SKRIPSI

Oleh

Wulan Suci Wahyuningtyas

NIM 131710101108

**JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2018**



**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN HIDROLISAT PROTEIN
IKAN AIR LAUT DAN IKAN AIR TAWAR**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Strata Satu Jurusan Teknologi Hasil Pertanian dan mencapai gelar Sarjana Teknologi Pertanian

Oleh

**Wulan Suci Wahyuningtyas
NIM 131710101108**

**JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2018**

PERSEMBAHAN

Karya tulis ini saya persembahkan kepada :

1. Allah SWT yang telah memberikan rahmat, hidayah kemudahan dan kekuatannya selama ini;
2. Orang tuaku tercinta, Ibu Jumiye dan Bapak Sukei yang telah memberikan do'a, dukungan, keikhlasan, dan kasih sayang yang besar selama ini;
3. Adikku Dwi Kurnianing Ratri dan Tri Dias Elvanarose serta seluruh keluargaku, terimakasih atas doa, cinta dan dukungan kalian selama ini;
4. Semua guru saya sejak TK sampai perguruan tinggi yang terhormat, telah memberikan ilmu, membimbing dengan penuh kesabaran dan keikhlasan;
5. Jajaran Dekanat Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember;
6. Teman-teman seperjuangan FTP 2013, terimakasih atas persahabatan yang terjalin selama ini;
7. Teman-teman THP B 2013 (*Kapak Corporation*), terimakasih atas persahabatan dan kekeluargaan yang terjalin selama ini;
8. Almater tercinta, Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.

MOTO

“Allah akan meninggikan orang-orang yang beriman diantara kamu dan orang-orang yang diberi ilmu pengetahuan beberapa derajat”

(Terjemahan Surat Al-Mujadalah Ayat 11)

“Dia mengetahui apa yang masuk ke dalam bumi dan apa yang keluar dari padanya dan apa yang turun dari langit dan apa yang naik kepadanya. Dan Dia bersama kamu dimana saja kamu berada. Dan Allah Maha Melihat apa yang kamu kerjakan”

(Terjemahan Surat Al Hadiid Ayat 4)

“Jika Anda ingin bahagia, tetapkan sasaran yang membangkitkan pikiran, membebaskan energi, dan menginspirasi harapan Anda”

-Andrew Carnegie-

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Wulan Suci Wahyuningtyas

NIM : 131710101108

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Aktivitas Antioksidan Hidolizat Protein Ikan Air Laut dan Ikan Air Tawar” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan disebutkan sumbernya dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenar-benarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 18 Desember 2017

Yang menyatakan,

Wulan Suci Wahyuningtyas
NIM 131710101108

SKRIPSI

**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN HIDROLISAT PROTEIN IKAN AIR LAUT
DAN IKAN AIR TAWAR**

oleh

Wulan Suci Wahyuningtyas

NIM 131710101108

Pembimbing:

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

Dosen Pembimbing Anggota : Riska Rian Fauziah, S.Pt., M.P

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Aktivitas Antioksidan Hidolizat Protein Ikan Air Laut dan Ikan Air Tawar”, telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember pada:

hari/tanggal : Selasa, 12 Desember 2017

tempat : Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember

Dosen Pembimbing Utama

Dosen Pembimbing Anggota

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

Riska Rian Fauziah, S.Pt., M.P
NIP 198509272012122001

Tim Penguji

Ketua

Anggota

Dr. Nurhayati, S.TP., M.Si
NIP 197904102003122004

Dr. Nita Kuswardhani, S.TP., M.Eng.
NIP 197107311997022001

Mengesahkan,

Dekan

Fakultas Teknologi Pertanian
Universitas Jember

Dr. Siswoyo Soekarno, S.TP., M.Eng.
NIP 196809231994031009

RINGKASAN

Aktivitas Antioksidan Hidrolisat Protein Ikan Air Laut dan Ikan Air Tawar; Wulan Suci Wahyuningtyas, 131710101108; 2017; 84 halaman; Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.

Antioksidan merupakan salah satu senyawa yang sangat diperlukan oleh tubuh untuk menghambat aktivitas oksidasi sel tubuh oleh radikal bebas. Antioksidan dapat ditemukan pada bahan pangan hewani misalnya daging atau hidrolisat protein dari bahan pangan hewani tertentu yang mengandung senyawa bioaktif peptida. Salah satu produk hidrolisat yang terbukti mempunyai aktivitas antioksidan adalah hidrolisat protein ikan. Hidrolisat protein diperoleh dari proses hidrolisis enzimatis menggunakan enzim protease biduri. Hidrolisat protein ikan bisa didapatkan dari jenis ikan laut atau ikan air tawar yang memiliki kandungan protein yang cukup tinggi. Komoditi hasil perikanan yang mempunyai potensi menguntungkan diantaranya adalah ikan baji-baji (*Platycephalidae cymbacephalus*) dan ikan bibisan (*Apogon albimaculosus*). Selain komoditi hasil perikanan laut, terdapat beberapa jenis ikan air tawar seperti ikan wader (*Rasbora Jacobsoni*) dan ikan tawes (*Barbonymus gonionotus*) yang bisa dimanfaatkan karena memiliki potensi untuk diproduksi sebagai hidrolisat protein yang mempunyai aktivitas antioksidan.

Rancangan penelitian menggunakan *Experimental laboratory* dengan dua faktor. Faktor A adalah jenis ikan dan faktor B adalah konsentrasi penambahan enzim biduri. Proses pembuatan hidrolisat protein diawali dengan proses *deboning* dan eviserasi, kemudian dilakukan penghancuran dan homogenisasi. Suspensi daging ikan yang didapatkan kemudian dihidrolisis dengan suhu 55°C selama 3 jam dengan penambahan enzim biduri sesuai perlakuan. Hidrolisat basah yang diperoleh kemudian dilakukan pengeringan dengan *freeze drying* dan dilakukan analisis derajat hidrolisis, aktivitas antioksidan metode DPPH dan *reducing power*, komposisi asam amino, dan distribusi berat molekul protein.

Hasil penelitian menunjukan aktivitas antioksidan hidrolisat protein ikan laut jenis baji-baji, bibisan dan ikan air tawar jenis wader, tawes berturut-turut memiliki %RSA sebesar 39,33%; 51,01%; 42,70% dan 53,21%. Nilai IC_{50} sebesar 1261,44 ppm; 1027,20 ppm; 1159,76 ppm dan 935,84 ppm. Nilai *reducing power* sebesar 0,501; 0,515; 0,508 dan 0,524. Komposisi asam amino hidrolisat protein ikan air laut jenis bibisan dan ikan air tawar jenis tawes memiliki 15 macam asam amino, diantaranya adalah asam glutamat, asam aspartat dan *lysine* dengan nilai berturut-turut sebesar 13,95%; 8,80%; dan 8,87% pada hidrolisat protein ikan tawes, serta 13,34%; 8,36%; dan 8,20% pada hidrolisat protein ikan bibisan. Distribusi berat molekul hidrolisat protein ikan air laut jenis bibisan memiliki nilai sebesar 20,84 kDa; 50,66 kDa, sedangkan berat molekul hidrolisat protein ikan air tawar jenis tawes sebesar 23,09 kDa; 59,08 kDa.

SUMMARY

Antioxidant Activity of Protein Hydrolysates Obtained From Saltwater and Freshwater Fish; Wulan Suci Wahyuningtyas, 131710101108; 2017; 84 Pages; Department of Agricultural Product Technology, Faculty of Agricultural Technology, University of Jember.

Antioxidants is one of the compounds are needed by the human body to inhibit the activity of cell oxidation by free radicals. Antioxidants obtained from vegetables, grains, and nuts that contain lots of vitamin C, E, A and β -carotene. Not only in vegetables and fruits, antioxidants also found in animal resources such as meat or protein hydrolysates which containing peptide bioactive compounds. One of hydrolysates products which shown to have antioxidant activity is fish protein hydrolysates. Hydrolysates protein was obtained from enzymatic hydrolysis process using biduri enzyme. Fish protein hydrolysates obtained from the sea fish or freshwater fish which have a high protein content. Fisheries commodities which have potential benefits include baji-baji fish (*Platycephalidae cymbacephalus*) and bibisan fish (*Apogon albimaculosus*). In addition, there are several types of freshwater fish such as wader fish (*Rasbora Jacobsoni*) and tawes fish (*Barbonymus gonionotus*) that could be utilized because they has a potential to produced as a protein hydrolyzate which contain antioxidant activity.

The experimental design in this research were used experimental laboratory with two factor. The A factor was the type of fish and the B factor was the biduri enzyme concentration. The making process of protein hydrolysates begins with deboning and eviseration process followed by destruction and homogenization. The next process was hydrolysis process at 55°C for 3 hours with the addition of biduri enzyme according to treatment. Fish protein hydrolysates then conducted analysis include degree of hydrolysis, antioxidant activity using DPPH and reducing power methods, amino acid composition, and protein molecular weight distribution.

The results showed that antioxidant activity of protein hydrolysates obtained from saltwater fish included baji-baji, bibisan fish and freshwater fish include wader, tawes had percent value of inhibition (% RSA) respectively 39,33%; 51,01%; 42,70% and 53,21%. IC_{50} value was about 1261,44 ppm; 1027,20 ppm; 1159,76 ppm and 935,84 ppm. The reducing power value was 0,501; 0,515; 0,508 and 0,524. Protein hydrolysates obtained from bibisan fish and tawes fish had 15 kinds of amino acid such as glutamic acid, aspartic acid and lysine, respectively 13,95%; 8,80%; and 8,87% in tawes protein hydrolysates, and 13,34%; 8,36%; and 8,20% in the bibisan protein hydrolysates. The molecular weight distribution of protein hydrolyzate obtained from bibisan fish had a value about 20,84 kDa; 50,66 kDa, whereas the molecular weight of protein hydrolysates obtained from tawes fish was 23,09 kDa; 59,08 kDa.

PRAKATA

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Aktivitas Antioksidan Hidrolisat Protein Ikan Air Laut dan Ikan Air Tawar”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan Strata Satu (S1) pada Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember. Dalam penyusunan skripsi ini penulis tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu dalam kesempatan ini penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. ALLAH SWT yang selalu memberikan rahmat dan hidayah-Nya sehingga dapat menyelesaikan Karya Tulis ini dengan baik;
2. Dr. Siswoyo Soekarno, S.TP., M.Eng., selaku Dekan Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember;
3. Prof. Dr. Yuli Witono, S.TP., M.P., selaku Dosen Pembimbing Akademik dan Dosen Pembimbing Utama, yang telah meluangkan waktu dan pikiran dengan sabar dan tulus guna memberikan bimbingan dan pengarahan demi kemajuan, penyelesaian penelitian, dan penulisan skripsi ini;
4. Ibu Riska Rian Fauziah, S.Pt., M.P., selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu dan pikiran dengan sabar dan tulus guna memberikan bimbingan dan pengarahan demi kemajuan, penyelesaian penelitian, dan penulisan skripsi ini;
5. Dr. Nurhayati, S.TP., M.Si dan Dr. Nita Kuswardhani, S.TP., M.Eng. selaku tim penguji yang telah memberikan saran dan evaluasi demi perbaikan skripsi ini;
6. Seluruh karyawan dan teknisi Laboratorium Kimia dan Biokimia, Laboratorium Analisa Terpadu, dan Laboratorium Rekayasa Proses Pengolahan Hasil Pertanian di Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember;

7. Ibu Jumiye, dan Bapak Sukei serta seluruh keluarga yang telah memberikan do'a dan semangat yang luar biasa demi terselesaikannya skripsi ini;
8. Rekan tim penelitian, Sadewa Aziz D, Lilik Krisna M., dan mbak Wiji Lestari yang telah memberikan semangat selama penelitian;
9. Teman-teman THP B 2013 (*Kapak Corporation*) yang telah memberikan semangat, doa, dan motivasi;
10. Teman-teman FTP 2013 yang telah memberikan semangat, doa, dan motivasi;
11. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu, yang telah membantu penyusunan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan skripsi ini masih banyak kekurangan dan sangat mengharap saran dan kritik yang bersifat membangun dari semua pihak. Semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi penulis, dan dapat menambah wawasan pembaca pada umumnya.

Jember, Desember 2017

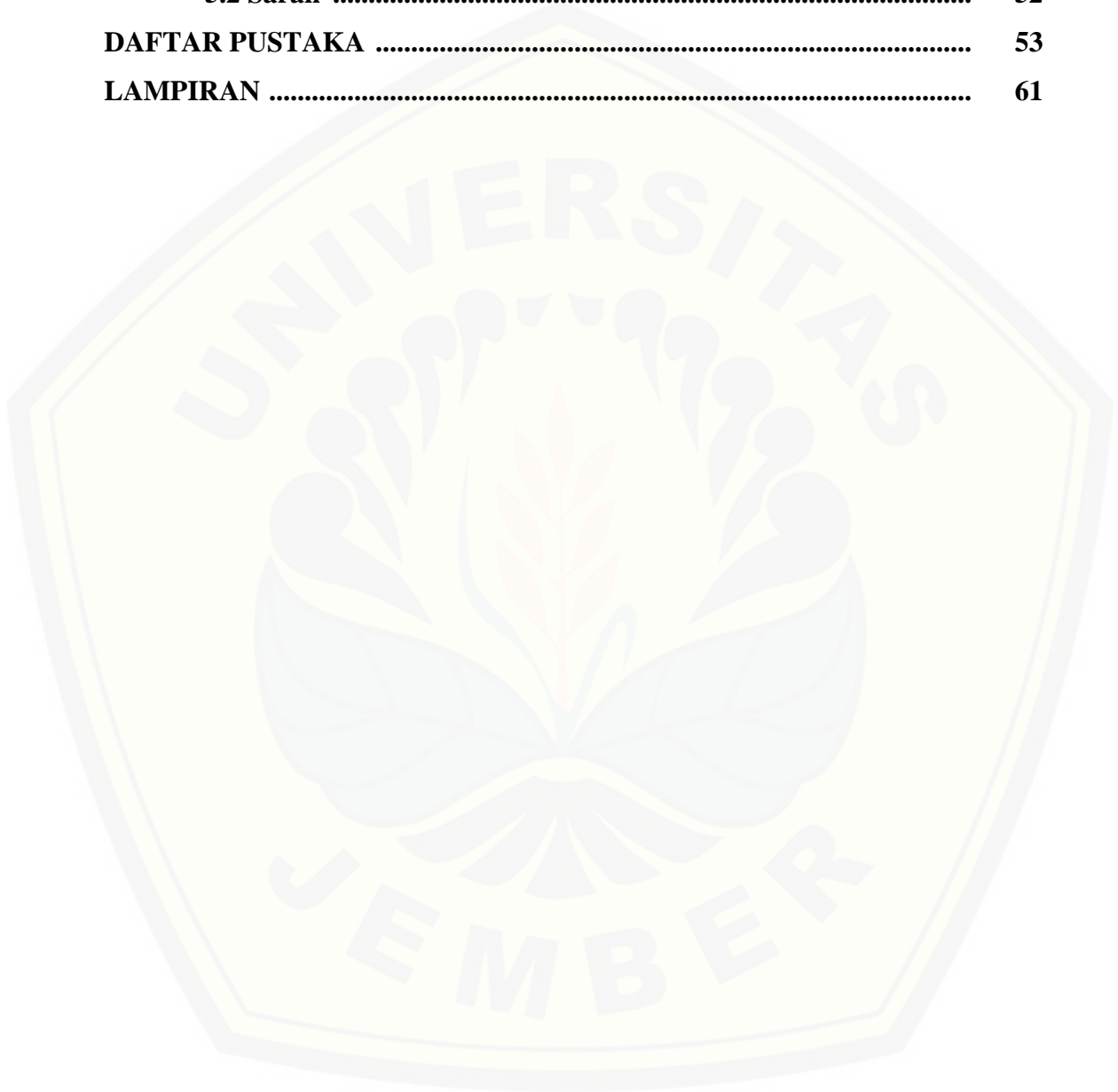
Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
SUMMARY	x
PRAKATA	xii
DAFTAR ISI	xiv
DAFTAR TABEL	xvii
DAFTAR GAMBAR	xviii
DAFTAR LAMPIRAN	xix
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Penentuan Aktivitas Antioksidan	5
2.2 Antioksidan dari Golongan Peptida	8
2.3 Peptida	10
2.4 Hidrolisat Protein.....	11
2.5 Proses Hidrolisis Protein	12
2.6 Enzim Protease Biduri	14

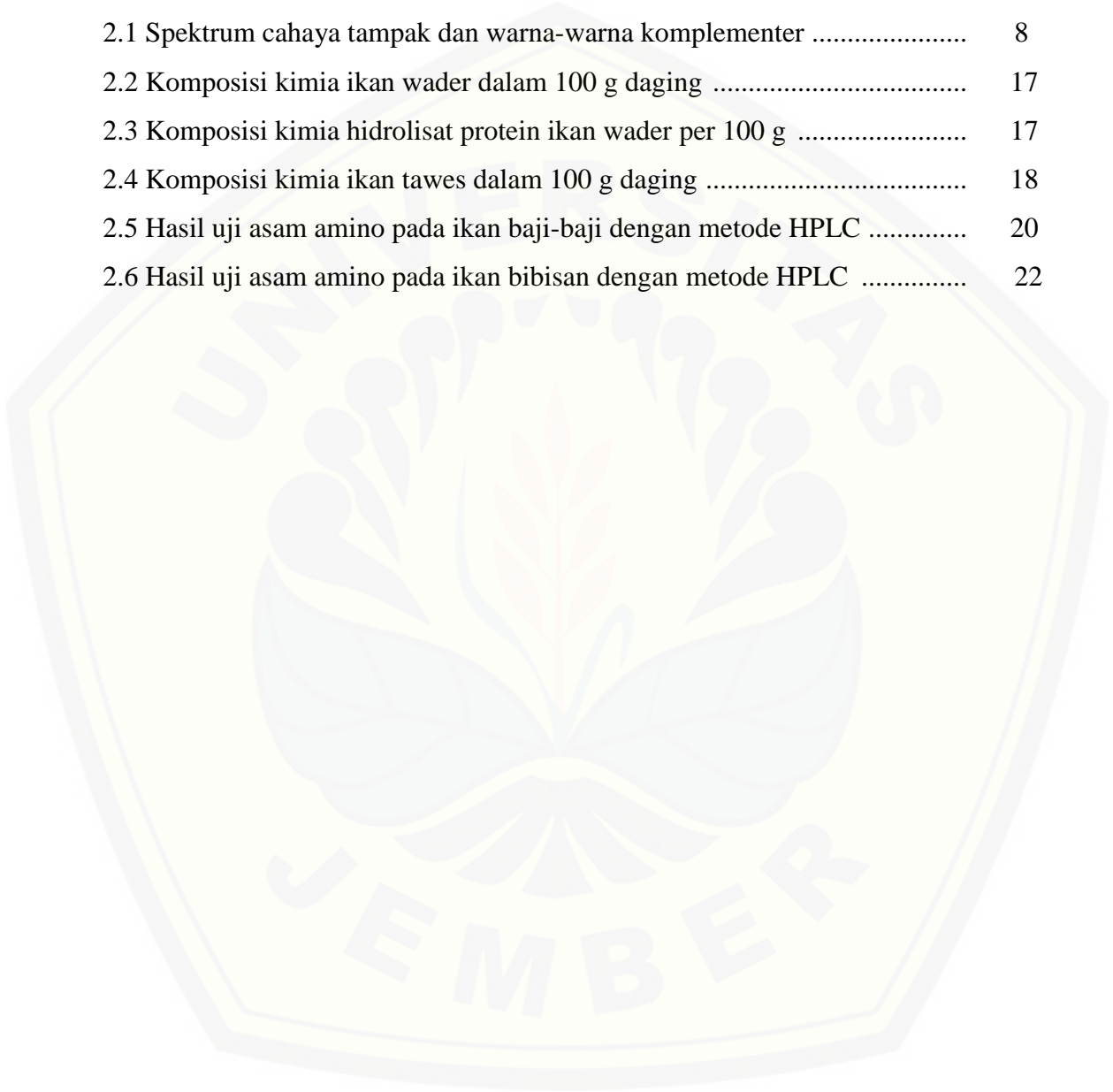
2.7 Ikan Wader.....	15
2.8 Ikan Tawes	17
2.9 Ikan Baji-baji	19
2.9 Ikan Bibisan	20
BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN	23
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	23
3.2 Bahan dan Alat Penelitian	23
3.2.1 Bahan Penelitian	23
3.2.2 Alat Penelitian	24
3.3 Metode Penelitian	24
3.3.1 Rancangan Penelitian	24
3.3.2 Pelaksanaan Penelitian	24
3.4 Parameter Analisis	27
3.5 Prosedur Analisis	27
3.5.1 Derajat Hidrolisis	27
3.5.2 Persentase Total Nitrogen	28
3.5.2 Aktivitas Antioksidan	29
3.5.3 Komposisi Asam Amino	31
3.5.4 Distribusi Berat Molekul	33
3.6 Analisa Data	34
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	35
4.1 Penelitian Pendahuluan	35
4.1.1 Kadar Protein	35
4.1.2 Penentuan Konsentrasi Enzim Terbaik.....	37
4.2 Aktivitas Antioksidan Hidrolisat Protein Ikan	41
4.2.1 Aktivitas Antioksidan DPPH dan IC ₅₀	41
4.2.2 <i>Reducing Power</i>	44
4.3 Komposisi Asam Amino	46
4.4 Distribusi Berat Molekul.....	49

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



DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Spektrum cahaya tampak dan warna-warna komplementer	8
2.2 Komposisi kimia ikan wader dalam 100 g daging	17
2.3 Komposisi kimia hidrolisat protein ikan wader per 100 g	17
2.4 Komposisi kimia ikan tawes dalam 100 g daging	18
2.5 Hasil uji asam amino pada ikan baji-baji dengan metode HPLC	20
2.6 Hasil uji asam amino pada ikan bibisan dengan metode HPLC	22



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Reaksi antara radikal DPPH dengan senyawa antioksidan	6
2.2 Mekanisme reaksi senyawa peptida dalam menghambat radikal	9
2.3 Ikatan Peptida	11
2.4 Struktur protein sebelum dan sesudah proses hidrolisis	13
2.5 Reaksi katalisis enzim protease dalam menghidrolisis ikatan peptida protein	15
2.6 Ikan wader (<i>Rasbora jacobsoni</i>)	16
2.7 Ikan tawes (<i>Barbonymus gonionotus</i>)	18
2.8 Ikan Baji-baji (<i>Platycephalidae cymbacephalus</i>)	19
2.9 Ikan bibisan (<i>Apogon albimaculosus</i>)	21
4.1 Kadar protein daging ikan wader, tawes, baji-baji, dan bibisan	36
4.2 Derajat hidrolisis potein ikan wader, tawes, baji-baji dan bibisan dengan menggunakan protease biduri	38
4.3 Aktivitas penangkapan radikal bebas DPPH (%RSA) hidrolisat protein ikan wader, tawes, baji-baji dan bibisan dengan konsentrasi enzim yang berbeda	40
4.4 Nilai %RSA hidrolisat protein ikan wader, tawes, baji-baji dan bibisan setelah <i>freeze drying</i>	42
4.5 Nilai IC ₅₀ hidrolisat protein ikan wader, tawes, baji-baji dan bibisan setelah <i>freeze drying</i>	43
4.6 Nilai <i>reducing power</i> hidrolisat protein ikan wader, tawes, baji-baji dan bibisan setelah <i>freeze drying</i>	45
4.7 Komposisi asam amino hidrolisat protein ikan wader dan tawes	46
4.8 Berat molekul hidrolisat protein ikan tawes (I) dan ikan bibisan (II)	50

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
A. Data Hasil Analisis	61
A.1 Kadar protein ikan wader, tawes, baji-baji dan bibisan.....	61
A.2 Aktivitas antioksidan (Penentuan konsentrasi enzim terbaik berdasarkan %RSA tertinggi) metode DPPH.....	61
A.3 Derajat Hidrolisis (Hasnaliza <i>et al.</i> , 2010) (Penentuan konsentrasi enzim terbaik berdasarkan derajat hidrolisis tertinggi)	62
A.4 Aktivitas antioksidan hidrolisat protein ikan tahap 1 (<i>Freeze drying</i>) metode DPPH.....	62
A.5 Aktivitas antioksidan hidrolisat protein ikan tahap 1 (<i>Freeze drying</i>) metode <i>Reducing power</i>	68
A.6 Komposisi asam amino.....	69
A.7 Berat molekul protein	70
B. Pembuatan bahan kimia	74
B.1 Bahan kimia pada analisis derajat hidrolisis	74
B.2 Bahan kimia pada analisis aktivitas antioksidan metode DPPH	74
B.3 Bahan kimia pada analisis aktivitas antioksidan metode <i>reducing power</i>	77
B.4 Bahan kimia pada komposisi asam amino menggunakan HPLC.....	78
B.5 Bahan kimia pada analisis berat molekul protein SDS-PAGE.....	79
C. Dokumentasi	
C.1 Dokumentasi bahan baku dan produk hidrolisat protein	81
C.2 Tahapan produksi hidrolisat protein ikan	81
C.3 Pengujian aktivitas antioksidan hidrolisat protein ikan (metode DPPH)	82

C.4 Pengujian aktivitas antioksidan hidrolisat protein ikan (metode <i>reducing power</i>).....	83
C.5 Pengujian derajat hidrolisis.....	84



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Antioksidan merupakan senyawa yang diperlukan oleh tubuh untuk menangkal radikal bebas. Asupan antioksidan bisa didapatkan dari sayuran, biji-bijian, kacang-kacangan, dan buah-buahan yang banyak mengandung vitamin C, E, A dan β -karoten (Winarsi, 2007). Antioksidan juga dapat ditemukan pada bahan pangan hewani misalnya daging atau hidrolisat protein dari bahan pangan hewani tertentu yang mengandung senyawa bioaktif peptida (Je *et al.*, 2008). Peptida merupakan fragmen pecahan protein yang tersusun dari 3-10 asam amino (Mine *et al.*, 2006). Aktivitas antioksidan peptida sangat ditentukan oleh komposisi dan urutan asam amino penyusun peptida. Pada umumnya, peptida yang memiliki sifat sebagai antioksidan mampu bertindak sebagai pengikat radikal bebas, donor proton dan menghambat pengikatan ion logam.

Hidrolisat protein memiliki potensi sebagai antioksidan dengan kemampuannya dalam mereduksi radikal bebas (*free radical scavenging*), donor proton dan pengikat ion logam (Samaranayaka & Li-Chan, 2011). Menurut Park *et al.* (2001), hidrolisat protein dapat menghambat oksidasi lipid dalam makanan dan sistem seluler. Aktivitas antioksidan dari hidrolisat protein tergantung pada jenis peptida dalam hidrolisat (Wiriyaphan *et al.*, 2011). Menurut Mendis *et al.* (2005), hidrolisat protein yang mengandung asam amino hidrofobik yaitu *proline*, *leucine*, *alanine*, *tryptophan* dan *phenylalanine* memiliki aktivitas antioksidan. Peptida yang mengandung *tyrosine* dan *methionine* juga menunjukkan aktivitas antioksidan yang tinggi, diikuti oleh *cystein* dan *histidine* (Davalos *et al.*, 2004). Asam aspartat, asam glutamat dan *lysine* memiliki peran yang penting untuk mengkelat ion logam oleh sisi karboksil dan asam amino kelompok dalam rantai samping asam amino (Rajapakse *et al.*, 2005). Salah satu produk hidrolisat yang terbukti memiliki aktivitas antioksidan adalah hidrolisat protein ikan (Je *et al.*, 2008). Hidrolisat protein ikan diproduksi melalui proses hidrolisis enzimatis

yang menggunakan enzim protease sebagai katalisator. Enzim protease dapat diperoleh dari getah tanaman, salah satunya adalah getah tanaman biduri. Ketersediaan tanaman biduri sangat melimpah dan banyak ditemukan di pesisir pantai. Hasil karakterisasi enzim protease biduri berdasarkan spesifitasnya termasuk dalam golongan eksopeptidase (Witono, 2009). Jenis eksopeptidase akan memecah polipeptida pada ujung protein, sehingga dihasilkan peptida rantai panjang dan asam amino. Produksi hidrolisat protein ikan secara enzimatik bisa dilakukan pada jenis ikan laut dan ikan air tawar yang memiliki kandungan protein yang cukup tinggi.

Beberapa jenis ikan air tawar dan ikan air laut Indonesia banyak yang bisa dimanfaatkan sebagai hidrolisat protein. Komoditi hasil perikanan yang mempunyai potensi menguntungkan diantaranya adalah ikan baji-baji (*Platycephalidae cymbacephalus*) dan ikan bibisan (*Apogon albimaculosus*). Pada tahun 2012, produksi penangkapan ikan baji-baji dan bibisan di Kabupaten Sumenep mencapai 23,934 dan 84,575 ton (Purwandhani, 2013). Ikan baji-baji dan bibisan biasanya hanya digunakan sebagai bahan baku pembuatan kerupuk. Selain ketersediaannya yang melimpah dan minimnya pemanfaatan dari kedua ikan tersebut, nilai ekonomi kedua ikan tersebut juga sangat rendah, yaitu berkisar antara Rp. 3000 rupiah perkilogram. Selain komoditi hasil perikanan laut, terdapat beberapa jenis ikan air tawar seperti ikan wader (*Rasbora Jacobsoni*) dan ikan tawes (*Barbonymus gonionotus*) yang bisa dimanfaatkan karena memiliki potensi untuk diproduksi sebagai hidrolisat protein yang mempunyai aktivitas antioksidan. Ikan wader, tawes, baji-baji dan bibisan memiliki kadar protein yang relatif tinggi, berturut-turut sebesar 12,56%, 19%, 17,86% dan 18,26%. Kadar protein yang relatif tinggi tersebut bisa meningkatkan nilai ekonomi dan nilai guna dalam segi pangan fungsional ikan air laut dan ikan air tawar. Upaya yang bisa dilakukan adalah dengan memanfaatkan kandungan protein ikan tersebut sebagai produk protein hidrolisat yang memiliki potensi sebagai antioksidan (Je *et al.*, 2008). Senyawa antioksidan sangat berperan penting baik dalam industri pangan maupun bidang kesehatan (Balti *et al.*, 2011). Hidrolisat protein ikan memiliki aktivitas antioksidan yang bermanfaat untuk mencegah ketengikan pada

makanan (Venugopal 2006), apabila dilakukan pemurnian senyawa hidrolisat dapat dimanfaatkan sebagai senyawa bioaktif dalam bentuk *nutraceutical*. Aktivitas antioksidan dari hidrolisat protein ikan air laut jenis baji-baji, bibisan dan ikan air tawar jenis wader, dan tawes diharapkan mampu menambah pengetahuan tentang teknologi pengolahan ikan tersebut menjadi produk yang menguntungkan baik secara ekonomi maupun nutrisi pangan.

1.2 Rumusan Masalah

Ikan air laut jenis baji-baji dan bibisan mengandung protein masing-masing sebesar 17,86% dan 18,26%. Ikan air tawar jenis wader dan tawes mengandung protein masing-masing sebesar 12,56% dan 19%. Menurut Je *et al.*, (2008), kandungan protein yang cukup tinggi pada masing-masing jenis ikan bisa dimanfaatkan menjadi produk hidrolisat protein. Hidrolisat protein ikan diproduksi melalui proses hidrolisis enzimatis yang menggunakan enzim protease biduri sebagai katalisator. Hidrolisat protein ikan diketahui mengandung senyawa bioaktif berupa antioksidan yang dapat mereduksi senyawa radikal bebas yang berbahaya bagi tubuh (Je *et al.*, 2008). Masalah yang harus dijawab dalam penelitian ini adalah seberapa besar aktivitas antioksidan pada hidrolisat protein ikan air laut jenis baji-baji dan ikan bibisan, serta ikan air tawar jenis wader dan tawes.

1.3 Tujuan

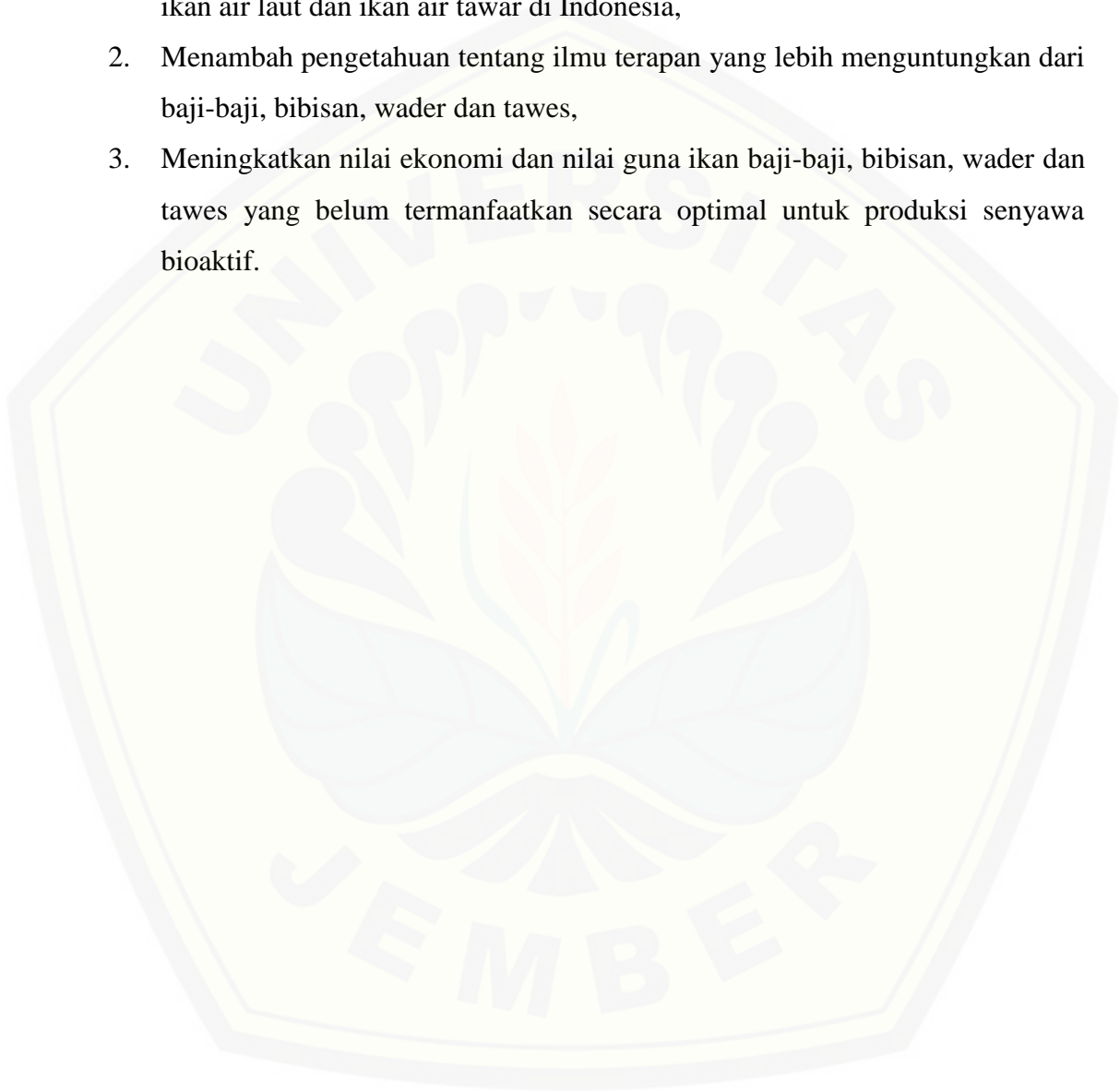
Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Mengetahui aktivitas antioksidan hidrolisat protein ikan air laut jenis baji-baji, bibisan dan ikan air tawar jenis wader dan tawes.
2. Mengetahui komposisi asam aminohidrolisat ikan air laut dan ikan air tawar dengan aktivitas antioksidan tertinggi.
3. Mengetahui distribusi berat molekul protein hidrolisat protein ikan air laut dan ikan air tawar dengan aktivitas antioksidan tertinggi.

1.4 Manfaat

Manfaat yang diharapkan dari hasil penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Mendorong penggalan sumber-sumber antioksidan alami berbasis potensi ikan air laut dan ikan air tawar di Indonesia,
2. Menambah pengetahuan tentang ilmu terapan yang lebih menguntungkan dari baji-baji, bibisan, wader dan tawes,
3. Meningkatkan nilai ekonomi dan nilai guna ikan baji-baji, bibisan, wader dan tawes yang belum dimanfaatkan secara optimal untuk produksi senyawa bioaktif.



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

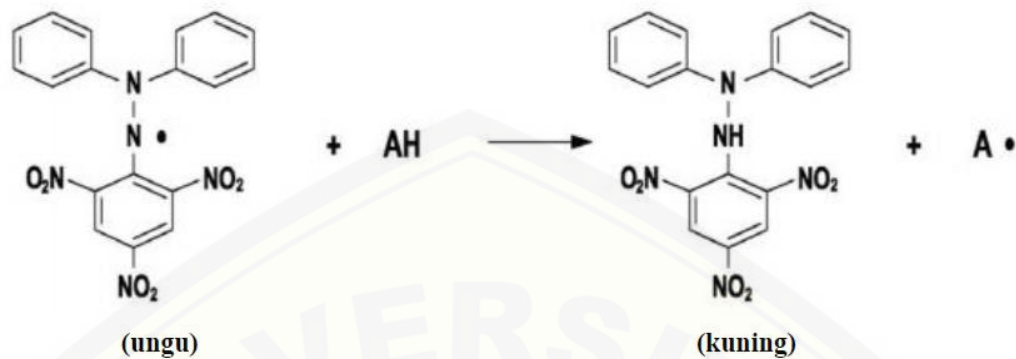
2.1 Penentuan Aktivitas Antioksidan

Aktivitas antioksidan pada bahan makanan tidak dapat diukur secara langsung, melainkan melalui efek antioksidan dalam mengontrol proses oksidasi. Metode yang digunakan untuk mengukur aktivitas antioksidan didasarkan pada kemampuan antioksidan dalam mencegah proses oksidasi oleh radikal. Beberapa metode penentuan antioksidan yang paling umum digunakan adalah metode DPPH dan *reducing power*. Kedua metode tersebut dibedakan berdasarkan jenis radikal dan cara kerja senyawa antioksidan.

2.1.1 Metode DPPH

Metode penangkapan radikal bebas senyawa DPPH (*2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl*) merupakan metode yang paling umum digunakan dalam pengujian aktivitas antioksidan (Mailandari, 2012). Metode uji penangkapan radikal bebas DPPH merupakan metode pengukuran aktivitas antioksidan berdasarkan pada *hydrogen atom transfer* (HAT) dan *electron transfer* (ET) (Prior *et al.*, 2005). DPPH (*1,1-difenil-2-pikrilhidrazil*) ($C_{18}H_{12}N_5O_6$) berperan sebagai radikal bebas akan bereaksi dengan antioksidan membentuk DPPH-H (*1,1-difenil-2-pikrihidrazin*) ($C_{18}H_{13}N_5O_6$) dan radikal antioksidan. Antioksidan akan mendonorkan atom hidrogennya kepada radikal DPPH untuk melengkapi kekurangan elektron dan membentuk radikal antioksidan yang lebih stabil (Prakash, 2001). Reaksi ini menyebabkan terjadinya perubahan warna DPPH yang semula ungu menjadi DPPH-H berwarna kuning yang dapat diukur dengan spektrofotometer sinar tampak pada panjang gelombang 517 nm, sehingga aktivitas penurunan radikal bebas oleh sampel dapat ditentukan (Juniarti *et al.*, 2009). Metode tersebut merupakan prinsip dasar DPPH sebagai senyawa untuk mengukur aktivitas antioksidan pada berbagai macam sampel. Panjang gelombang maksimum untuk larutan DPPH adalah 517 nm. Panjang gelombang dengan

kisaran 500-560 nm dapat menyerap warna hijau dari warna komplementer ungu (Underwood *et al.*, 1986).



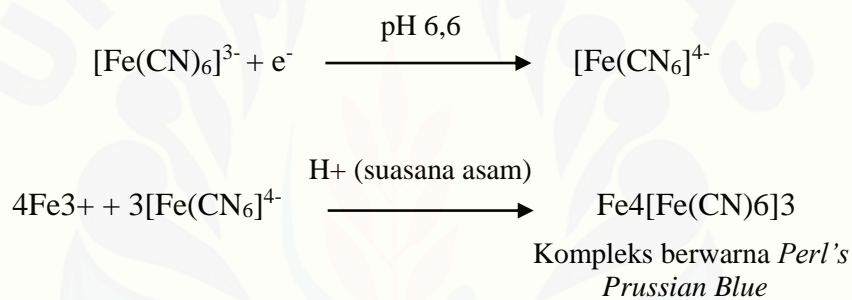
Gambar 2.1 Reaksi antara radikal DPPH dengan senyawa antioksidan (Sumber: PISOCHI *et al.*, 2009)

DPPH mempunyai elektron *phi* yang dapat mengalami delokalisasi ke seluruh bagian molekul, sehingga molekul tidak mengalami dimer seperti kebanyakan senyawa radikal bebas lain. Proses delokalisasi ini memberikan warna ungu gelap yang dikarakterisasi oleh pita absorpsi dalam pelarut etanol pada panjang gelombang 517 nm. Ketika DPPH direaksikan dengan senyawa yang dapat mendonasikan atom hidrogen, maka warna ungu tersebut akan memudar yang menggeser pita serapan menuju panjang gelombang lebih kecil menjadikan warna DPPH menjadi kuning. Parameter yang dapat digunakan untuk menginterpretasi hasil uji DPPH 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 (Blois, 1958).

2.1.2 Reducing Power

Metode *reducing power* ini didasarkan pada prinsip peningkatan absorpsi dari reaksi campuran. Peningkatan absorpsi menunjukkan peningkatan aktivitas antioksidan. Menurut Oyaizu (1986), *reducing power* didasarkan pada *electron transfer* (ET) dan tidak didasarkan pada *hydrogen atom transfer* (HAT). Kebanyakan senyawa antioksidan mempunyai kemampuan *transfer* atom hidrogen. Uji antioksidan lain diperlukan untuk dapat memberikan

hasil dari proses transfer hidrogen, seperti DPPH dan ORAC assay (Prior *et al.*, 2005). Uji *reducing power* dilakukan untuk mengetahui kemampuan suatu bahan pangan sebagai antioksidan sekunder. Senyawa antioksidan yang memiliki kemampuan mereduksi akan 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. Ferisianida kemudian bereaksi dengan feriklorida (FeCl_3) membentuk kompleks berwarna *Perl's Prussian Blue* yang memiliki absorbansi maksimum pada panjang gelombang 700 nm (Ferreira *et al.*, 2007). Suasana asam pada analisis *reducing power* digunakan untuk menjaga kelarutan besi (Prior *et al.*, 2005). Reaksi yang terjadi pada uji *reducing power* terdapat pada persamaan berikut.



Senyawa antioksidan membentuk kompleks berwarna terhadap kalium ferrisianida, asam trikloroasetat dan besi (III) klorida. Peningkatan pada serapan campuran reaksi menunjukkan kekuatan mereduksi dari antioksidan. Hal ini diakibatkan oleh semakin banyaknya kompleks *Perl's Prussian Blue* yang terbentuk. Perubahan warna yang terjadi pada analisis *reducing power* dapat diukur pada panjang gelombang 700 nm. Panjang gelombang dengan kisaran 610-750 nm dapat menyerap warna merah dari warna komplementer biru-hijau (Underwood *et al.*, 1986). Warna komplementer merupakan warna yang dapat dilihat dalam kehidupan sehari-hari. Misalnya suatu zat akan berwarna orange bila menyerap warna biru dari spektrum sinar tampak dan suatu zat akan berwarna hitam bila menyerap semua warna yang terdapat pada spektrum sinar tampak. Untuk lebih jelasnya, spektrum cahaya tampak dan warna-warna komplementer dari spektrofotometer dapat dilihat pada **Tabel 2.1**

Tabel 2.1 Spektrum cahaya tampak dan warna-warna komplementer

Panjang gelombang (nm)	Warna	Warna komplementer
400-435	Violet	Kuning-Hijau
435-480	Biru	Kuning
480-490	Hijau-biru	Orange
490-500	Biru-hijau	Merah
500-560	Hijau	Ungu
560-580	Kuning-hijau	Violet
580-595	Kuning	Biru
595-610	Orange	Hijau-biru
610-750	Merah	Biru-hijau

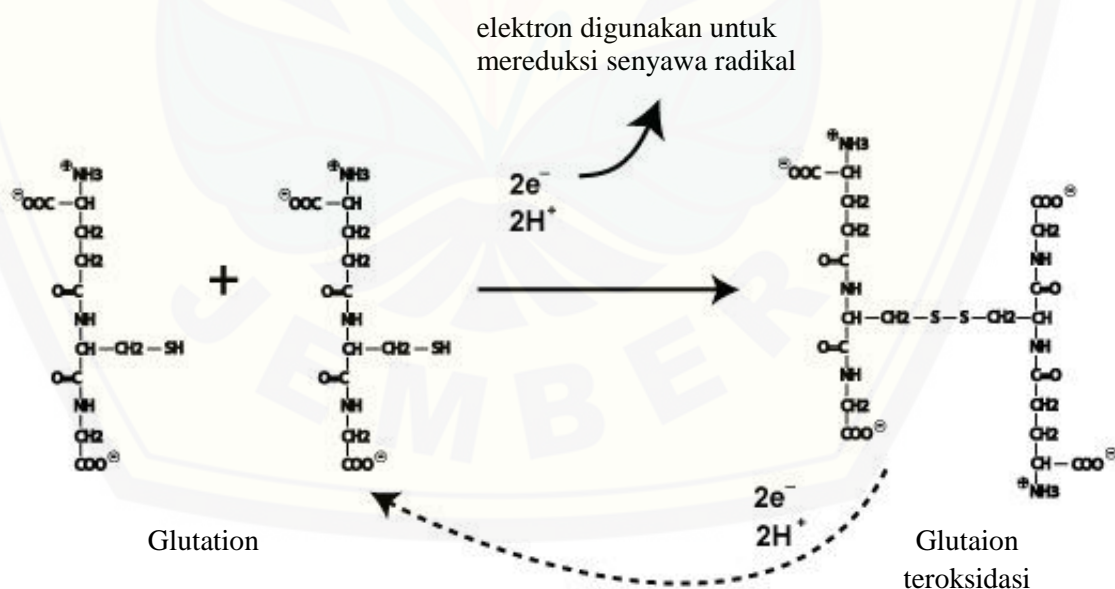
Sumber: Underwood *et al.* (1986)

2.2 Antioksidan dari Golongan Peptida

Antioksidan merupakan senyawa kimia yang dapat menyumbangkan satu atau lebih elektron kepada radikal bebas, sehingga dapat menunda atau mencegah oksidasi yang disebabkan oleh radikal bebas (Winarsi, 2007). Senyawa antioksidan memiliki berat molekul kecil yang mampu menginaktivasi berkembangnya reaksi oksidasi, sehingga kerusakan sel dapat dihambat (Winarsi, 2007). Secara endogen, antioksidan juga diproduksi oleh tubuh berupa enzim superoksida dismutase atau SOD, katalase, dan glutathion peroksidase, serta senyawa lain berupa flavonoid, albumin, bilirubin, dan seruloplasmin (Winarsi, 2007). Senyawa antioksidan juga dapat ditemukan pada bahan pangan hewani misalnya daging atau hidrolisat protein dari bahan pangan hewani tertentu yang mengandung senyawa bioaktif peptida. Menurut Je *et al.* (2008), hidrolisat protein ikan telah terbukti memiliki aktivitas antioksidan. Aktivitas antioksidan dari hidrolisat protein tergantung pada jenis peptida dalam hidrolisat.

Peptida bioaktif adalah suatu jenis peptida yang memiliki urutan komposisi asam amino yang pasti, merupakan fragmen pecahan protein, dengan protein aslinya sendiri tidak memiliki keaktifan biologi (Mine *et al.*, 2006). Senyawa peptida menunjukkan sifat-sifat spesifik, segera setelah lepas dari atau dilepaskan dari molekul protein aslinya oleh kerja enzim. Peptida bioaktif biasanya memiliki berat molekul yang rendah, hanya terdiri atas 3 sampai 10 asam amino, dan biasanya bersifat hidrofobik. Senyawa peptida bioaktif bekerja sangat aktif dan

mempunyai efek positif bagi kesehatan saluran pencernaan manusia (Mine *et al.*, 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. Pada umumnya, peptida yang mempunyai sifat sebagai antioksidan mampu bertindak sebagai pengikat radikal bebas, donor proton dan menghambat pengikatan ion logam. Pengikatan ion logam oleh peptida juga bisa merubah siklus redoks yang sangat penting untuk beberapa oksidasi pembentukan logam (Xiong, 2010). Peptida yang bersifat sebagai antioksidan umumnya terdiri dari 2-10 residu asam amino, dan urutan asam amino menjadi faktor penentu keberhasilan antioksidan peptida. Beberapa macam asam amino seperti tirosin, metionin, histidin, lisin, dan triptofan telah diketahui memiliki aktivitas antioksidan (Wang *et al.*, 2005). Berikut merupakan mekanisme penghambatan radikal oleh senyawa glutathion yang merupakan peptida yang terdiri dari asam amino glutamat, sistein dan glisin.



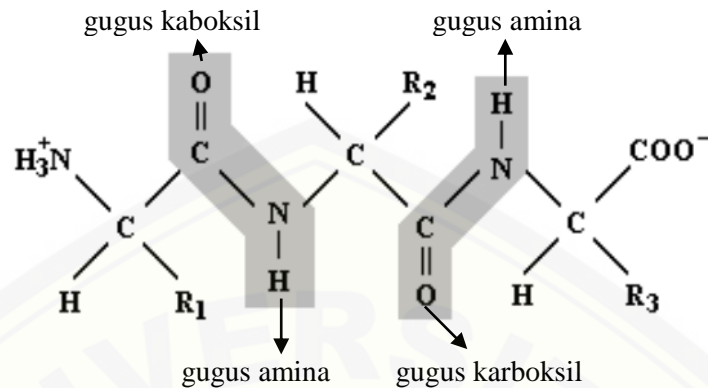
Gambar 2.2 Mekanisme reaksi senyawa peptida dalam menghambat radikal
(Sumber: Xiong, 2010)

Peptida bioaktif dapat ditemukan pada bahan pangan seperti daging, susu atau produk hasil hidrolisat protein. Menurut Park *et al.* (2001), hidrolisat protein dapat menghambat oksidasi lipid dalam makanan dan seluler sistem. Aktivitas antioksidan dari hidrolisat protein tergantung pada jenis peptida dalam hidrolisat. Hidrolisat kaya peptida yang mengandung asam amino hidrofobik, seperti *proline*, *leucine*, *alanine*, *tryptophan*, dan *phenylalanine* diyakini memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi (Mendis *et al.*, 2005). Peptida yang mengandung *tryptophan*, *tyrosine*, *methionine* juga menunjukkan aktivitas antioksidan yang tinggi, diikuti oleh *cystein* dan *histidine* (Davalose *et al.*, 2004). Asam aspartat, asam glutamat dan *lysine* memiliki peran yang penting dalam pengkelat ion logam oleh karboksil dan asam amino kelompok dalam rantai samping (Rajapakse *et al.*, 2005). Pada dasarnya, hidrolisat protein hewani dan nabati semuanya mengandung peptida antioksidan. Tidak semua peptida bersifat antioksidan dan beberapa ada yang prooksidasi tergantung pada jenis peptida dalam hidrolisat.

2.3 Peptida

Peptida merupakan fragmen pecahan protein yang terbentuk dari dua atau lebih asam amino (Mine *et al.*, 2006). Jika jumlah asam amino masih di bawah 50 molekul disebut peptida, namun jika lebih dari 50 molekul disebut dengan protein. Asam amino saling berikatan dengan ikatan peptida. Ikatan peptida atau ikatan amida adalah ikatan kovalen yang terbentuk antara 2 molekul ketika gugus karboksil ($-\text{COOH}$) dari molekul yang satu bereaksi dengan gugus amino (NH_3) dari molekul yang lain, dengan melepaskan satu molekul air. Reaksi ini tergolong sintesis dehidrasi, yaitu penggabungan 2 molekul monomer dengan melepaskan satu molekul air. Reaksi ini juga dikenal sebagai reaksi kondensasi dan umumnya terjadi pada molekul asam amino. Unsur asam amino penyusun peptida disebut residu asam amino. Penamaan peptida didasarkan kepada banyaknya residu, bukan banyaknya ikatan peptida. Peptida yang disusun oleh tiga residu disebut tripeptida. Peptida yang disusun oleh lebih dari sepuluh residu asam amino disebut polipeptida. Suatu jenis polipeptida mempunyai aktivitas fisiologis

tertentu dan apabila dilakukan penggantian satu residu atau lebih maka dapat mengurangi aktivitas fisiologis dari polipeptida tersebut.



Gambar 2.3 Ikatan Peptida (Sumber: Sugiyono, 2004)

Ikatan peptida merupakan ikatan tingkat primer. Dua molekul asam amino yang saling diikat dengan cara demikian disebut ikatan dipeptida. Bila tiga molekul asam amino, disebut tripeptida dan bila lebih banyak lagi disebut polipeptida. Polipeptida yang hanya terdiri dari sejumlah beberapa molekul asam amino disebut oligopeptida. Molekul protein adalah suatu polipeptida, dimana sejumlah besar asam-asam aminonya saling dipertautkan dengan ikatan peptida tersebut (Gaman, 1992). Asam amino dan peptida dapat dihasilkan dengan cara menghidrolisis protein.

2.4 Hidrolisat Protein

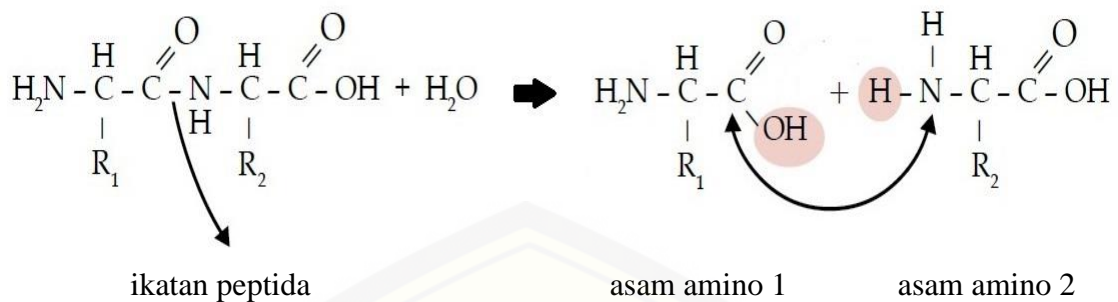
Hidrolisat protein merupakan produk yang dihasilkan dari peruraian protein menjadi senyawa-senyawa berantai pendek karena adanya proses hidrolisis baik oleh enzim, asam maupun basa (Pigot *et al.*, 1990). Proses hidrolis yang sempurna akan diperoleh hidrolisat yang terdiri dari campuran 18 sampai 20 macam asam amino. Produk akhir dapat berbentuk cair, pasta atau bubuk yang bersifat higroskopis. Hidrolisat protein bisa didapatkan dari bahan pangan yang mengandung protein seperti kacang-kacangan, daging, maupun ikan. Pengolahan ikan menjadi hidrolisat protein bertujuan mendapatkan bahan pangan yang lebih mudah dicerna oleh tubuh karena proteinya telah terurai menjadi asam amino dan

peptida yang lebih sederhana. Pada umumnya, pemanfaatan hidrolisat protein ikan adalah untuk pembuatan pepton yang digunakan sebagai media pertumbuhan mikroorganisme dalam perkembangan bioteknologi (Wijayanti, 2009). Hidrolisat protein ikan pada industri pangan dapat ditambahkan ke dalam suplemen makanan diet dan pada industri farmasi digunakan untuk pembuatan produk-produk dermatologis, seperti krim pembersih muka dan pelembab kulit. Selain itu, hidrolisat protein ikan dapat digunakan secara fungsional sebagai bahan pengemulsi (Schimidi *et al.*, 1994). Hidrolisat protein ikan memiliki potensi yang baik untuk dijadikan sebagai sumber komponen peptida bioaktif yang belum banyak dikembangkan. Hidrolisat protein ikan memiliki aktivitas menangkap radikal bebas, menghambat peroksidasi lipid, dan antioksidan.

Hidrolisat protein ikan bisa didapatkan dari jenis ikan laut yang memiliki kandungan protein yang cukup tinggi, misalnya ikan baji-baji dan ikan bibisan yang ketersediaannya cukup melimpah. Dewasa ini, telah dikembangkan hidrolisat protein ikan dari jenis ikan air tawar yaitu ikan tawes dan wader. Produksi hidrolisat protein dari ikan wader dan ikan tawes merupakan proses yang cukup sederhana. Hidrolisat protein ikan tersebut memiliki sifat fungsional penting dalam pengolahan pangan, seperti *flavour enhancer*, pembentuk tekstur, dan kelarutan tinggi dalam air (Hall *et al.*, 1992).

2.5 Proses Hidrolisis Protein

Hidrolisis protein merupakan suatu proses degradasi protein secara hidrolitik dengan katalisator berupa asam, basa, atau enzim proteolitik yang menghasilkan produk berupa asam amino dan peptida (Hasnaliza *et al.*, 2010). Hidrolisis ikatan peptida akan menyebabkan beberapa perubahan pada protein, yaitu meningkatkan kelarutan karena bertambahnya kandungan NH_3^+ dan COO^- serta berkurangnya berat molekul protein atau polipeptida, rusaknya struktur globular protein. Berikut merupakan mekanisme reaksi protein sebelum terhidrolisis dan setelah terhidrolisis.



Gambar 2.4 Struktur protein sebelum dan sesudah proses hidrolisis
(Sumber: Hidayat, 2005)

Hidrolisis protein bisa dilakukan dengan dengan tiga macam cara yaitu hidrolisis asam, hidrolisis asam dan hidrolisis menggunakan enzim (Pigot *et al.*, 1990). Hidrolisis asam dilakukan dengan menggunakan asam kuat anorganik, seperti HCl atau H₂SO₄ pekat dan dipanaskan pada suhu 100°C. Hidrolisis asam dapat dilakukan dengan tekanan di atas satu atmosfer, selama beberapa jam. Menurut Girindra (1993), efek samping yang terjadi dengan hidrolisis asam ialah rusaknya beberapa asam amino seperti triptofan, dan threonin. Hidrolisis basa merupakan proses pemecahan polipeptida dengan menggunakan basa atau alkali kuat, seperti NaOH dan KOH pada suhu tinggi selama beberapa jam, dengan tekanan di atas satu atmosfer. Menurut Girindra (1993), asam amino serin dan threonin akan rusak dengan proses hidrolisis menggunakan metode basa. Teknik hidrolisis yang ketiga yaitu hidrolisis enzimatis. Hidrolisis enzimatis dilakukan dengan mempergunakan enzim. Dapat digunakan satu jenis enzim saja, atau beberapa jenis enzim yang berbeda. Penambahan enzim perlu dilakukan pengaturan pada kondisi pH dan suhu optimum, dikarenakan enzim dapat bekerja secara maksimal pada pH dan suhu tertentu.

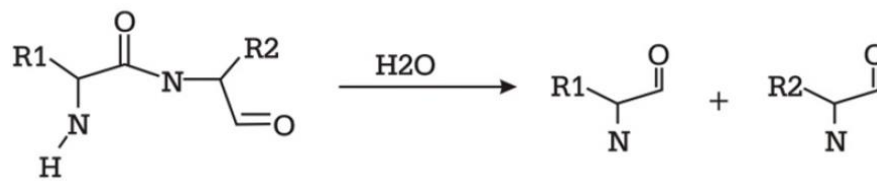
Metode enzimatik lebih disukai dari teknik hidrolisis kimia karena hidrolisis kimia melibatkan penggunaan asam kuat atau alkali yang dapat menurunkan kandungan asam amino. Hidrolisis secara enzimatis lebih efisien, murah, menghasilkan hidrolisat protein ikan tanpa kehilangan asam amino esensial, serta terhindar dari perubahan atau kerusakan produk yang bersifat non-hidrolitik, karena pada proses hidrolisis dengan asam maupun basa dapat merusak sebagian

asam amino dan juga menghasilkan senyawa beracun (Ariyani *et al.*, 2003). Menurut Hidayat (2005), hidrolisis protein dipengaruhi oleh konsentrasi bahan penghidrolisis, suhu, pH dan waktu hidrolisis. Peningkatan konsentrasi enzim akan meningkatkan volume hidrolisat protein ikan yang bersifat tak larut menjadi senyawa nitrogen yang bersifat larut. Enzim yang dapat digunakan untuk hidrolisis protein adalah enzim proteolitik. Dimana enzim ini dapat membantu pemutusan ikatan peptida pada rantai protein dan dapat meningkatkan kadar protein terlarut.

2.6 Enzim Protease Biduri

Enzim adalah protein yang berfungsi sebagai katalisator untuk reaksi-reaksi kimia di dalam sistem biologi (Suhartono, 1992). Katalisator berperan dalam mempercepat reaksi kimia. Enzim bekerja sangat spesifik dalam arti suatu enzim hanya dapat mengkatalisa satu atau beberapa reaksi. Sebagai contoh adalah enzim protease yang merupakan jenis enzim golongan hidrolase yang berfungsi untuk menghidrolisis protein (Akhdiya, 2003). Enzim protease dapat diperoleh dari getah tanaman, salah satunya adalah getah tanaman biduri. Enzim protease bisa didapatkan dari tanaman biduri baik dari getah, batang, maupun daun (Witono *et al.*, 2006). Hasil karakterisasi enzim protease biduri berdasarkan spesifitasnya termasuk dalam golongan eksopeptidase (Witono, 2009). Jenis eksopeptidase memecah polipeptida pada ujung protein, sehingga dihasilkan peptida rantai panjang dan asam amino.

Enzim protease biduri memiliki suhu hidrolisis optimum pada suhu 55°C dan aktivitas optimal enzim protease biduri pada pH 7 (Witono *et al.*, 2007a). Enzim biduri juga memiliki daya tahan terhadap panas (*termostabilitas*) yang cukup tinggi dan terdenaturasi dengan cepat pada suhu 90°C. Berat molekul enzim biduri adalah sekitar 25,18 kDa (Witono *et al.*, 2007a). Reaksi katalisa protease secara umum adalah menghidrolisis ikatan peptida protein seperti pada **Gambar 2.5**



R1 = rantai peptida sebelumnya
 R2 = rantai peptida sesudahnya

Gambar 2.5 Reaksi katalisis enzim protease dalam menghidrolisis ikatan peptida protein (Sumber: Winarno, 1993)

Ekstrak kasar protease biduri mempunyai kemampuan untuk mengempukkan daging (Witono *et al.*, 2002) dan menggumpalkan susu sebagai rendemen keju (Witono *et al.*, 2003). Penggunaan enzim biduri (bersifat eksopeptidase) dalam pembuatan hidrolisat protein kedelai menghasilkan nilai kadar air dan tingkat ketengikan yang rendah serta nilai kadar protein terlarut dan jumlah produk Maillard yang tinggi (Witono *et al.*, 2007b). Semakin besar konsentrasi penggunaan enzim biduri (bersifat eksopeptidase) dalam pembuatan hidrolisat protein ikan bernilai ekonomi rendah menghasilkan nilai produk Maillard yang semakin tinggi dan tingkat ketengikan rendah. Hal ini menunjukkan enzim biduri dapat menghasilkan hidrolisat protein dengan karakteristik baik (Witono *et al.*, 2014a).

2.7 Ikan Wader

Ikan wader (*Rasbora jacobsoni*) merupakan ikan yang mempunyai ukuran kurang lebih 7-20 cm, memiliki warna tubuh coklat kekuningan, berwarna agak gelap di bagian dorsal, sisik tepi ikan wader bergaris coklat, dan biasanya hidup secara berkoloni. Ikan wader sering ditemukan hidup berkelompok di dasar sungai-sungai kecil berbatu yang berarus sedang dengan kisaran suhu antara 22-24°C dan pH perairan antara 6,0 – 6,5 (Froese *et al.*, 2010). Menurut Djumanto *et al.* (2008), di Indonesia terdapat 43 spesies ikan dari genus *Rasbora*, salah satunya adalah *Rasbora jacobsoni* yang tersebar di wilayah Sumatra, Jawa,

Kalimantan, Bali, Nusa Tenggara dan Sulawesi. Setiap jenis ikan wader memiliki sifat yang berbeda, baik ukuran tubuh, kecepatan pertumbuhan, dan rasa dagingnya (Budiharjo, 2002). Klasifikasi ikan wader (*Rasbora jacobsoni*) menurut Budiharjo (2002), adalah sebagai berikut.

Kingdom : Animalia
Phylum : Chordata
Sub Philum : Vertebrata
Class : Pisces
Ordo : Cypriniformes
Familia : Cyprinidae
Genus : *Rasbora*
Species : *Rasbora jacobsoni*



Gambar 2.6 Ikan wader (*Rasbora jacobsoni*) (Sumber: Sari, 2015)

Ikan wader memiliki kandungan protein yang relatif tinggi yaitu sebesar 12,56% (Akbariwati, 2015). Kandungan protein yang tinggi ini membuatnya cocok untuk diolah sebagai bahan pangan sehari-hari maupun olahan lain seperti hidrolisat protein. Pada umumnya ikan wader dimanfaatkan untuk dikonsumsi secara lokal sebagai lauk, karena selain kandungan proteinya yang tinggi, ikan wader memiliki tekstur daging yang lembut dan rasa yang gurih, duri di dalam tubuhnya juga tidak terlalu besar. Ikan wader pada umumnya dimanfaatkan untuk dikonsumsi secara lokal sebagai lauk (Indrayana, 2012). Berikut adalah kandungan nilai gizi ikan wader dalam 100 gram daging.

Tabel 2.2. Komposisi kimia ikan wader dalam 100 g daging

Komposisi kimia	Nilai
Kalori (Kal)	84
Air (%)	76
Protein (g)	14,8
Lemak (g)	2,3
Kolesterol (mg)	58
Zat besi (mg)	0,3

Sumber : Zaelani (2012).

Dewasa ini, telah dikembangkan hidrolisat protein ikan dari jenis ikan air tawar yaitu ikan wader. Produksi hidrolisat protein dari ikan wader merupakan proses yang cukup sederhana. Langkah awal yang dilakukan adalah pencampuran bahan baku dengan air, kemudian diikuti dengan penyesuaian suhu dan pH optimal, penambahan enzim dan reaksi hidrolisis enzimatis pada waktu tertentu, penginaktivasian enzim, langkah terakhir adalah pengeringan dan pemekatan (Kristinsson, 2000). Komposisi kimia hidrolisat ikan dapat dilihat pada **Tabel 2.3**

Tabel 2.3. Komposisi kimia hidrolisat protein ikan wader per 100 g

Komposisi kimia	Nilai
Air (g)	7,28
Abu (g)	8,19
Lemak (g)	16,27
Total Nitrogen (g)	20,07

Sumber : Lestari (2016).

2.8 Ikan Tawes

Ikan tawes (*Barbonymus gonionotus*) merupakan ikan yang mempunyai bentuk badan agak panjang kurang lebih 7 - 15 cm dan pipih dengan punggung meninggi. Ikan tawes banyak ditemukan di Indonesia terutama di perairan pulau Jawa seperti rawa, danau, dan sungai yang jernih dengan kisaran suhu antara 22-28°C dan pH perairan berkisar antara 7. Ikan tawes mempunyai mulut yang kecil terletak pada ujung hidung, memiliki garis rusuk sempurna yang berjumlah antara 29-31 buah. Badan ikan tawes berwarna keperakan agak gelap di bagian punggung. Sirip punggung dan sirip ekor ikan tawes berwarna abu-abu atau kekuningan (Kottelat *et al.*, 1993). Ikan tawes termasuk ke dalam famili

Cyprinidae, sama seperti ikan mas dan ikan nilem. Berikut adalah klasifikasi ikan tawes menurut Nelson (2006).

Kingdom : Animalia
 Phylum : Chordata
 Class : Actinopterygi
 Sub Class : Neopterygi
 Ordo : Cypriniformes
 Familia : Cyprinidae
 Genus : *Barbonymus*
 Species : *Barbonymus gonionotus*



Gambar 2.7 Ikan tawes (*Barbonymus gonionotus*) (Sumber: Maria, 2012)

Dalam kehidupan sehari-hari, ikan tawes banyak dimanfaatkan sebagai menu pangan. Ikan tawes banyak disukai oleh masyarakat untuk dikonsumsi karena mempunyai daging dengan tekstur yang kenyal, sedikit lemak, dan bergizi tinggi. Ikan ini memiliki nilai protein sebesar 19% (Nio, 2012) dan kandungan asam lemak Omega-3 sebesar 1,5/100 gram (Muthmainnah, 2008). Berikut adalah kandungan nilai gizi ikan tawes dalam 100 gram daging.

Tabel 2.4. Komposisi kimia ikan tawes dalam 100 g daging

Komposisi kimia	Nilai
Energi (kal)	193
Air (g)	66
Protein (g)	19
Lemak (g)	13
Mineral (g)	20
Kalsium (mg)	48
Fosfor (g)	150
Besi (mg)	0,4

Sumber : Nio (2012).

2.9 Ikan Baji-baji

Ikan baji-baji (*Platycephalidae cymbacephalus*) merupakan salah satu jenis komoditas ikan inferior. Komoditas ikan inferior merupakan komoditas ikan yang mempunyai nilai ekonomis rendah yang belum banyak pemanfaatannya (Saputra, 2006). Ikan baji-baji memiliki nama latin *Platycephalus scaber*, *Cotus scaber*, dan *Thysanopris scaber* (Kuronuma *et al.*, 1986). Ciri-ciri dari ikan baji-baji adalah bentuk kepala dan tubuh picak, tubuh dan ekor pada bagian atas tertutup sisik kretoid yang berukuran kecil, serta sisik sikloid pada bagian bawah yang datar. Ikan famili *Platycephalidae* hidup di dasar laut yang dangkal berlumpur, berpasir dan kadang-kadang ditemukan pada daerah estuari.



Gambar 2.8 Ikan baji-baji (*Platycephalidae cymbacephalus*) (Sumber: Purwandani, 2015)

Ikan baji-baji mempunyai rasa enak dan daging yang tebal. Rasa enak yang dihasilkan ketika diolah tersebut dikarenakan kandungan asam amino prekursor rasa gurih yang tinggi. Pada uji komposisi asam amino yang telah dilakukan oleh Witono *et al.* (2014), ikan baji-baji memiliki 17 jenis asam amino. Berikut merupakan komposisi asam amino dari ikan baji-baji.

Tabel 2.5. Hasil uji asam amino pada ikan baji-baji dengan metode HPLC

Jenis asam amino	Satuan	Jumlah
L-aspartic acid	% (w/w)	2,100
L-serine	% (w/w)	0,504
L-glutamic acid	% (w/w)	3,218
Glycine	% (w/w)	0,968
L-histidine	% (w/w)	0,532
L-arginine	% (w/w)	1,449
L-threonine	% (w/w)	0,890
L-alanin	% (w/w)	1,224
L-proline	% (w/w)	0,802
L-cystine	% (w/w)	0,027
L-tyrosine	% (w/w)	0,688
L-valine	% (w/w)	1,175
L-methionine	% (w/w)	0,788
L-lysineHCL	% (w/w)	2,457
L-isoleucine	% (w/w)	1,121
L-leucine	% (w/w)	1,766
L-phenilalanine	% (w/w)	1,011

Sumber : Witono *et al.* (2014).

Ikan baji-baji banyak ditemukan di sekitar perairan Pulau Talango Kabupaten Sumenep - Madura. Secara umum, masyarakat talango memanfaatkan ikan tersebut menjadi bahan dasar pembuatan kerupuk karena rasanya yang sangat gurih. Rasa gurih tersebut dikarenakan kandungan asam glutamat yang tinggi. Harga ikan baji-baji pun relatif murah, yaitu Rp. 3000 per kilogram. Dengan harga yang sangat terjangkau dan pemanfaatan yang relatif minim, perlu adanya inovasi untuk meningkatkan nilai ekonomi dan nilai guna ikan tersebut, salah satunya adalah mengolah ikan tersebut menjadi hidrolisat protein.

2.10 Ikan Bibisan

Ikan bibisan (*Apogon albimaculosus*) merupakan salah satu jenis ikan yang tergolong karnivora, mempunyai ukuran badan yang kecil dan gerakannya cepat (Lieske, 1997). Beberapa jenis ikan bibisan berwarna terang dan mempunyai pola warna yang menarik. Tubuhnya kecil memanjang, agak tinggi dan pipih, kepalanya besar dengan mulut yang menonjol (Deptan, 2013).



Gambar 2.9 Ikan bibisan (*Apogon albimaculosus*) (Sumber: Purwandani, 2015)

Habitat ikan bibisan adalah disekitar pantai berkarang dan di antara rumput laut. Namun ada juga yang hidup diantara daerah pasang surut yang dangkal dan di perairan yang lebih dalam. Beberapa jenis ikan bibisan lebih suka hidup di perairan payau atau di perairan tawar yang berjarak beberapa mil dari laut. Ikan jenis ini banyak tersebar di perairan Maluku, Flores, Lampung, Kepulauan Seribu, Bali dan Banyuwangi (Maesen, 1993). Ikan bibisan juga banyak ditemui di perairan Pulau Talango - Madura. Secara umum, masyarakat Talango menganggap ikan bibisan adalah hama bagi para nelayan. Biasanya ikan bibisan hanya dimanfaatkan sebagai umpan dalam mencari ikan. Belum ada pemanfaatan yang lebih lanjut untuk menjadikan ikan tersebut mempunyai nilai ekonomi dan nilai guna yang lebih tinggi. Pada uji komposisi asam amino yang dilakukan, Ikan bibisan juga memiliki 17 jenis asam amino. Komposisi asam amino ikan bibisan dapat dilihat pada **Tabel 2.6**

Tabel 2.6. Hasil uji asam amino pada ikan bibisan dengan metode HPLC

Jenis asam amino	Satuan	Jumlah
L-aspartic acid	% (w/w)	1,915
L-serine	% (w/w)	0,484
L-glutamic acid	% (w/w)	3,150
Glycine	% (w/w)	0,764
L-histidine	% (w/w)	0,408
L-arginine	% (w/w)	1,208
L-threonine	% (w/w)	0,722
L-alanin	% (w/w)	1,053
L-proline	% (w/w)	0,632
L-cystine	% (w/w)	0,039
L-tyrosine	% (w/w)	0,548
L-valine	% (w/w)	1,035
L-methionine	% (w/w)	0,649
L-lysineHCL	% (w/w)	2,345
L-isoleucine	% (w/w)	0,975
L-leucine	% (w/w)	1,560
L-phenylalanine	% (w/w)	0,781

Sumber : Witono *et al.* (2014).

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan 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. Penelitian dilaksanakan pada bulan April hingga Oktober 2017.

3.2 Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah ikan baji-baji (*Platycephalidae cymbacephalus*), ikan bibisan (*Apogon albimaculosus*) yang diperoleh dari Desa Talango Kabupaten Sumenep – Madura. Ikan tawes (*Barbonymus gonionotus*) dan ikan wader (*Rasbora jacobsoni*) yang diperoleh di Pasar Kreongan, Kecamatan Sumbersari Kabupaten Jember. Enzim protease biduri hasil ekstraksi getah tanaman biduri yang diperoleh dari daerah pesisir Watu Ulo - Jember.

Bahan kimia analisis yang digunakan adalah aquadest, buffer fosfat 0,2 M pH 7, NaOH 0,01N, HCl 0,01N, etanol p.a, etanol 97%, BHT (*Butylated hydroxytoluene*), NaH₂PO₄, Na₂HPO₄, DPPH 0,1 mM, *potassium ferricyanide* 1%, TCA 10%, FeCl₃ 0,1%, TCA 20%, selenium, H₂SO₄ pekat, NaOH 40%, HCl 0,1 N, asam borat 4%, asam askorbat, buffer ekstraksi (50 mM MOPS-NAOH pH 7,5, 1 mM EDTA, 10 mM MgCl, dan 1 mM *Phenyl Methyl Sulfonyl Flouride* (PMSF)), reagen Bradford, *Buffer loading* (Tris-Cl 0,5 M pH 6,8; SDS 10%; *glycerol* 10%; *bromophenol blue*), *acrylamide* 15%, buffer elektroda (*Glycine* 192 mM, *Trisbase* 25 mM, SDS 0,1%), *Coomassie Brilliant Blue* (CBB), *Blue Prestained Protein Standart*, *ortoftalaldehida* (OPA), HCl 6 N, HCl 0,01 N,

larutan buffer kalium borat pH 10,4, fase gerak (larutan A (Na-asetat, Na-EDTA, metanol, THF) dan larutan B (metanol 95%, aquades)), *flouresensi*, *ultra techspere*, kertas *milipore* No. 45.

3.2.2 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian meliputi HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel*), spektrofotometer Shimadzu dan kuvetnya, destilator, vortex Thermolyne type 16700, *freeze dryer*, sentrifuge Yenaco model YC-1180 dan tabungnya, waterbath GFL 1083, lemari pendingin, *freezer*, *ice box*, pH meter Jen Way tipe 3320, blender *stainless steel* Philips, pemanas listrik Maspion, pisau *stainless steel*, neraca analitik Ohaus, pipet mikro, *eppendorf*, *yellow tip*, botol semprot, bulp pipet, *magnetic stirer*, penjepit, baskom dan alat-alat gelas (Pyrex dan Duran).

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian dilakukan menggunakan *experimental laboratory* dengan dua faktor. Faktor A adalah jenis ikan dan faktor B adalah konsentrasi penambahan enzim biduri. Adapun jenis ikan yang digunakan yaitu ikan bibisan (A1), ikan baji-baji (A2), ikan wader (A3), dan ikan tawes (A4). Konsentrasi enzim yang ditambahkan meliputi penambahan enzim biduri 1% (B1), penambahan enzim biduri 2% (B2), dan penambahan enzim biduri 3% (B3).

Percobaan dilakukan dengan tiga kali pengulangan dan dua kali pengulangan pengamatan (*duplo*). Data hasil penelitian diolah dengan *microsoft excel* dan dianalisis secara deskriptif. Data hasil analisis ditampilkan dalam bentuk tabel, dan untuk mempermudah interpretasi data, dibuat grafik dan histogram.

3.3.2 Pelaksanaan Penelitian

a. Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam tiga tahap, yaitu penelitian pendahuluan, penelitian utama tahap I, dan penelitian utama tahap II. Penelitian pendahuluan

dilakukan untuk menentukan konsentrasi penambahan enzim biduri terbaik (1%, 2%, dan 3%) yang ditentukan berdasarkan aktivitas antioksidan (% RSA) (Shimada *et al.*, 1992) dan derajat hidrolisisnya (Hasnaliza *et al.*, 2010). Penelitian utama tahap I adalah pembuatan hidrolisat kering dari perlakuan terbaik pada penelitian pendahuluan (penambahan enzim biduri 3%). Sampel yang didapatkan kemudian dilakukan pengujian aktivitas antioksidan metode DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) (Shimada *et al.* 1992), penentuan nilai IC_{50} , dan *reducing power* (Oyaizu, 1986). Penelitian utama tahap II adalah analisis komposisi asam amino (AOAC, 2005) dan distribusi berat molekul (Laemlli, 1970) pada hidrolisat ikan air laut dan ikan air tawar yang memiliki aktivitas antioksidan tertinggi.

b. Pembuatan Hidrolisat Protein

Pembuatan hidrolisat protein ikan wader, tawes, baji-baji dan bibisan mengacu pada metode Bhaskar *et al.* (2008) yang telah dimodifikasi. Ikan wader, tawes, baji-baji dan bibisan yang masih dalam keadaan segar dilakukan *deboning* dan eviserasi untuk menghilangkan kepala, tulang, sisik, isi perut dan ekor, sehingga dihasilkan daging ikan. Daging ikan yang diperoleh kemudian dilakukan pencucian menggunakan air mengalir. Tujuan dari proses pencucian ini untuk menghilangkan sisa kotoran setelah proses *deboning* dan eviserasi. Selanjutnya, daging ikan dilakukan penghancuran dan homogenisasi menggunakan blender dengan perbandingan aquades dan bahan adalah 2:1 (volume/berat) dari berat daging ikan. Suspensi yang didapatkan kemudian dilakukan pengondisian pH dengan menambahkan NaOH 0,01 N atau HCl 0,01 N sampai nilai pH mencapai angka 7. Proses hidrolisis menggunakan pH 7 dikarenakan enzim protease biduri memiliki aktivitas optimal pada pH 7 (Witono *et al.*, 2007a). Ketika nilai pH diubah, hal ini akan mengarah ke perubahan bentuk enzim. Perubahan tingkat pH yang signifikan akan membuat enzim dan substrat mengalami denaturasi, sehingga hidrolisis tidak akan berjalan secara optimal. Suspensi daging ikan yang kemudian dilakukan penambahan enzim biduri sebanyak 1%, 2%, dan 3% (v/w) untuk penelitian pendahuluan, dan 3% untuk penelitian utama tahap 1 dimana penambahan 3% merupakan penambahan enzim yang menghasilkan derajat

hidrolisis dan persen penghambatan tertinggi pada penelitian pendahuluan. Suspensi yang telah ditambahkan enzim kemudian diletakan dalam *waterbath* untuk dilakukan proses hidrolisis.

Hidrolisis dilakukan menggunakan *waterbath* suhu 55°C selama 3 jam. Proses hidrolisis dilakukan pada suhu 55°C selama 3 jam karena merupakan suhu dan waktu yang optimum untuk menghidrolisis protein ikan dengan enzim biduri. Jika suhu hidrolisis lebih dari 55°C, stabilitas struktur molekul enzim tidak dapat dipertahankan dan pudar, sehingga aktivitas proteolitiknya hilang. Sejalan dengan hal tersebut, jika hidrolisis dilakukan dibawah waktu 3 jam, hidrolisis tidak akan berjalan maksimal, sedangkan jika diatas 3 jam kerja enzim akan berada pada tahap stasioner. Menurut Shahidi *et al.*, (1995), tahap stasioner terjadi karena adanya penghambatan kinerja enzim untuk menghidrolisis substrat akibat terbentuknya produk dalam jumlah besar. Asam amino yang terbentuk dari proses hidrolisis akan menutup sisi aktif protein substrat, sehingga enzim tidak dapat melanjutkan proses hidrolisis. Setelah proses hidrolisis, hidrolisat yang diperoleh dipanaskan pada suhu 85°C selama 20 menit untuk inaktivasi enzim biduri dan menghentikan proses hidrolisis. Hidrosisat protein yang dihasilkan kemudian didinginkan dan diendapkan selama 24 jam pada suhu 4°C dengan tujuan mencegah kemungkinan proses hidrolisis yang masih berlangsung dan membekukan lemak yang terdapat pada hidrolisat basah sehingga lapisan lemak dapat dihilangkan dengan mudah. Setelah 24 jam, dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 30 menit dengan suhu 10°C untuk memisahkan fraksi terlarut (filtrat), fraksi tidak terlarut (pellet), dan lapisan lemak yang masih tersisa.

Fraksi tidak terlarut (pellet) sebagian besar merupakan lemak dan daging, sedangkan supernatan yang didapatkan merupakan hidrolisat protein basah yang selanjutnya akan dilakukan pengeringan dengan menggunakan *freeze drying*. Tujuan utama dari pengeringan menggunakan *freeze drying* adalah pengeringan bahan dengan meminimalisir kerusakan kandungan bahan terutama protein pada bahan yang mudah terdenaturasi karena panas. *Freeze drying* dilakukan dengan menggunakan suhu -50°C. Serbuk hidrolisat protein yang didapatkan kemudian

dilakukan analisis aktivitas antioksidan (Shimada *et al.*, 1992), *Reducing Power* (Oyaizu, 1968), komposisi asam amino (AOAC, 2005) dan distribusi berat molekul (Laemlli, 1970).

3.4 Parameter Analisis

Parameter analisis dalam penelitian ini terdiri dari parameter analisis pada penelitian pendahuluan, penelitian utama tahap 1, dan penelitian utama tahap 2. Parameter analisis pada penelitian pendahuluan meliputi kadar protein pada masing-masing ikan menggunakan metode Kjeldahl (AOAC, 2005), derajat hidrolisis menggunakan metode SN-TCA (*Soluble Nitrogen – Trichloroacetic acid*) (Hasnaliza *et al.*, 2010) yang selanjutnya dianalisis total protein menggunakan metode Kjeldahl (AOAC, 2005), dan aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH (Shimada *et al.*, 1992). Parameter analisis pada penelitian utama tahap 1 meliputi aktivitas antioksidan metode DPPH, penentuan nilai IC₅₀ (Shimada *et al.*, 1992) dan analisis aktivitas antioksidan metode *reducing power* (Oyaizu, 1986). Parameter analisis pada penelitian utama tahap 2 meliputi komposisi asam amino menggunakan HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) (AOAC, 2005), dan distribusi berat molekul protein menggunakan SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) (Laemlli, 1970).

3.5 Prosedur Analisis

3.5.1 Derajat hidrolisis (Hasnaliza *et al.*, 2010)

Persentase ikatan peptida yang terlepas akibat proses hidrolisis dapat dinyatakan dengan derajat hidrolisis. Rutherford (2010), menyatakan bahwa selama proses hidrolisis enzimatis berlangsung, terjadi pemutusan ikatan peptida pada molekul protein yang dikatalisis oleh enzim proteolitik. Derajat hidrolisis dihitung berdasarkan presentase rasio *trichloroacetic acid* (TCA). Sebanyak 20 ml hidrolisat protein ikan wader, tawes, baji-baji dan bibisan ditambahkan 20 ml TCA

20% (b/v). Campuran tersebut kemudian didiamkan selama 30 menit agar terjadi pengendapan. Setelah terjadi pengendapan lalu disentrifugasi (kecepatan 7800, selama 15 menit). Supernatan yang diperoleh kemudian dianalisis kadar nitrogennya menggunakan metode Kjeldahl (AOAC, 2005). Derajat hidrolisis dihitung menggunakan rumus berikut

$$\text{Derajat Hidrolisis (\%)} = \frac{\text{Nitrogen terlarut dalam TCA 20\% (b /v)}}{\text{Nitrogen total sampel}} \times 100\%$$

3.5.2 Persentase Total Nitrogen / Kadar Protein (AOAC, 2005)

Prinsip dari analisis total nitrogen sama dengan analisa protein, tanpa dikalikan dengan faktor konversi. Presentase total nitrogen dan kadar protein dianalisis dengan menggunakan metode Kjeldahl. Pada metode Kjeldahl, protein diukur berdasarkan jumlah nitrogen total yang ada di dalam sampel. Semakin banyak jumlah nitrogen yang terukur, maka semakin besar kadar protein yang terkandung dalam sampel. Bahan organik dalam sampel mengalami reaksi oksidasi dengan adanya asam sulfat (H_2SO_4). Ion amonium yang terbebas dari bahan organik tersebut, berikatan dengan ion sulfat membentuk amonium sulfat. Amonium sulfat terionisasi dalam air menjadi kation amonium dan anion sulfat. Penambahan NaOH menyebabkan ion amonium melepaskan satu atom hidrogennya dan membentuk amonia bebas. Amonia bebas sifatnya mudah menguap, oleh karena itu perlu ditampung dalam larutan asam borat. Satu atom hidrogen dalam asam borat diberikan kepada amonia sehingga membentuk ion amonium, ion amonium yang terbentuk dititrasi dengan HCl standar untuk mengetahui jumlahnya dalam larutan. Dalam hal ini, jumlah HCl yang dibutuhkan pada saat titrasi sebanding dengan jumlah ion amonium karena keduanya memiliki perbandingan mol yang sama (Hermiastuti, 2013).

Tahapan yang dilakukan dalam analisis protein terdiri dari tiga tahap, yaitu destruksi, destilasi dan titrasi. Sampel masing-masing sebanyak 5 ml hidrolisat protein ikan dimasukkan kedalam labu Kjeldahl, lalu ditambahkan 0,9 gram selenium dan 2 ml H_2SO_4 pekat. Sampel didestruksi pada suhu 410°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°C. Hasil destilasi ditampung dalam labu erlenmeyer 250 ml yang berisi campuran 15 ml asam borat (H₃BO₃) 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. Larutan blanko dianalisis seperti sampel. Persentase total nitrogen dihitung dengan rumus sebagai berikut:

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

3.5.2 Aktivitas Antioksidan

Analisis aktivitas antioksidan dilakukan dengan menggunakan dua metode. Penggunaan dua metode analisis antioksidan yang berbeda disebabkan oleh perbedaan mekanisme kerja dari kedua analisis. Pada metode DPPH, antioksidan memberikan sebuah atom hidrogen atau elektron untuk menstabilkan radikal bebas yang berupa DPPH. Pada metode *reducing power*, antioksidan bekerja dengan menekan pembentukan radikal bebas yang kemudian mencegah kerusakan oksidatif (Hue *et al.*, 2012). Berikut merupakan penjabaran dari metode analisis aktivitas antioksidan metode DPPH dan *reducing power*.

1. DPPH (Shimada *et al.*, 1992)

Aktivitas antioksidan dalam mereduksi radikal bebas dari hidrolisat protein ikan ditentukan dengan kemampuannya dalam mereduksi DPPH. DPPH (*1,1-difenil-2-pikrilhidrazil*) (C₁₈H₁₂N₅O₆) berperan sebagai radikal bebas akan bereaksi dengan antioksidan membentuk DPPH-H (*1,1-difenil-2-pikrihidrazin*) (C₁₈H₁₃N₅O₆) dan radikal antioksidan. Antioksidan akan mendonorkan atom hidrogennya kepada radikal DPPH untuk melengkapi kekurangan elektron dan membentuk radikal antioksidan yang lebih stabil (Prakash, 2001). Reaksi ini menyebabkan terjadinya perubahan warna DPPH yang semula ungu menjadi DPPH-H berwarna kuning yang dapat diukur dengan spektrofotometer sinar tampak pada panjang gelombang 517 nm,

sehingga aktivitas penurunan radikal bebas oleh sampel dapat ditentukan (Juniarti *et al.*, 2009). Metode tersebut merupakan prinsip dasar DPPH sebagai senyawa untuk mengukur aktivitas antioksidan pada berbagai macam sampel. Sampel yang diuji untuk penentuan konsentrasi enzim terbaik (penelitian pendahuluan) dilakukan pengenceran 20 kali dengan pelarut etanol p.a. Larutan sampel hidrolisat protein yang telah diencerkan diambil masing-masing sebanyak 1,5 ml dan direaksikan dengan larutan DPPH *difenil-2-pikrilhidrazil* 0,1 mM dalam tabung reaksi. Campuran tersebut kemudian divortex kurang lebih satu menit dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 517 nm untuk mengetahui persen inhibisi terhadap radikal DPPH.

Pada penelitian utama tahap II, produk yang diuji aktivitas antioksidannya merupakan hidrolisat protein yang telah dikeringkan menggunakan *freeze drying*. Hidrolisat protein dilarutkan dalam pelarut etanol p.a dengan konsentrasi 500, 1000, 1.500, 2000, dan 2500 ppm. Sebagai kontrol positif, digunakan antioksidan sintetis BHT (*Butylated hydroxytoluene*) dibuat dengan cara melarutkan dalam pelarut etanol p.a dengan konsentrasi 2, 4, 6, 8 dan 10 ppm. Larutan sampel dan larutan antioksidan pembanding diambil sebanyak 1,5 ml dan direaksikan dengan 1,5 ml larutan DPPH 0,1 mM dalam tabung reaksi. Campuran kemudian di vortex kurang lebih 1 menit dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Larutan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 517 nm. Selain pengukuran terhadap sampel, juga dilakukan pengukuran terhadap blanko. Pengukuran nilai blanko ini dilakukan untuk memperoleh nilai absorbansi yang nantinya digunakan sebagai acuan dari nilai absorbansi sampel. 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 persentase inhibisi dari masing masing konsentrasi, persamaan $y = ax + b$ ditentukan dengan perhitungan secara regresi linear 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%.

2. *Reducing power* (Oyaizu, 1986)

Uji *reducing power* dilakukan untuk mengetahui kemampuan suatu bahan pangan sebagai antioksidan sekunder. Semakin tinggi absorbansi dari sampel, semakin tinggi pula kemampuan mereduksinya (Tatiya *et al.*, 2011). *Reducing power* dari hidrolisat protein ikan wader, tawes, baji-baji, dan bibisan ditentukan menurut metode dari Oyaizu (1986). Sebanyak 1 ml sampel hidrolisat protein yang telah dilarutkan (0,001 gram/ml) dilakukan penambahan 2,5 ml larutan buffer fosfat 0,2 M (pH 6,6) dan *potassium ferricyanide* $K_3Fe(CN)_6$ 1%. Campuran tersebut diinkubasi pada suhu 50°C selama 20 menit. Selanjutnya sebanyak 2,5 ml larutan TCA 10% ditambahkan untuk menghentikan reaksi. Dari larutan tersebut, diambil sebanyak 2,5 ml ditambahkan dengan 2,5 ml akuades dan 0,5 ml $FeCl_3$ 0.1%. Setelah inkubasi selama 10 menit, dilakukan peneraan absorbansi larutan pada panjang gelombang 700 nm. Blanko mengandung semua reagen kecuali sampel. Nilai absorbansi hidrolisat protein pada panjang gelombang 700 nm menyatakan aktivitas *reducing power* hidrolisat protein. Peningkatan absorbansi reaksi mengindikasikan peningkatan aktivitas *reducing power*. Sebagai kontrol positif, digunakan asam askorbat dibuat dengan cara melarutkan dalam pelarut aquadest dengan konsentrasi 2, 4, 6, 8, dan 10 ppm.

3.5.3 Komposisi Asam Amino (AOAC, 2005)

Analisis komposisi asam amino dilakukan untuk mengetahui jenis asam amino yang terkandung didalam sampel hidrolisat protein ikan. Prinsip analisis asam amino menggunakan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) adalah 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

Kadar protein sampel hidrolisat protein ikan ditentukan terlebih dahulu dengan metode Kjeldahl (AOAC, 2005). Sampel yang mengandung 3 mg protein dimasukkan ke dalam tabung ulir, ditambah 1 mL HCl 6 N dan dialiri gas N₂, kemudian ditutup. Sampel tersebut dihidrolisis dalam oven bersuhu 110°C 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, dan disaring dengan kertas milipore No. 45.

2. Analisis asam amino dengan HPLC

Larutan bufer kalium borat pH 10,4 ditambahkan ke dalam sampel dengan perbandingan 1:1 sehingga diperoleh larutan sampel yang siap dianalisis. Larutan sampel sebanyak 10 µL dicampur dengan 25 µL pereaksi *ortoftalaldehida* (OPA). Hal yang sama dilakukan pada larutan standar asam amino. Larutan yang telah tercampur (baik sampel maupun standar) didiamkan selama 1 menit agar derivatisasi berlangsung sempurna. Larutan standar diinjeksikan ke dalam kolom HPLC sebanyak 5 µL, 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 : Fluoresensi

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

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

Persen asam amino dalam sampel dapat dihitung dengan rumus:

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

3.5.4 Distribusi berat molekul (Laemlli, 1970)

Analisis distribusi berat molekul protein dilakukan untuk mengetahui berat molekul protein pada hidrolisat protein ikan. Prinsip analisis distribusi berat molekul menggunakan SDS-PAGE adalah pemisahan komponen atau molekul bermuatan berdasarkan perbedaan tingkat migrasinya dalam sebuah medan listrik. Sebuah arus listrik dilewatkan melalui medium yang mengandung sampel yang akan dipisahkan. 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 (pH7,5), 1 mM EDTA, 10 mM MgCl, dan 1 mM *Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride* (PMSF) dihomogenkan. Homogenat kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4⁰C. Supernatan didapat dipindah ke *microtube* baru dan disimpan dalam suhu -80⁰C untuk dilakukan analisa.

2. Pengukuran kandungan protein

Penentuan kandungan protein dilakukan dengan menggunakan metode Bradford (1976). Sebanyak 5 µl supernatan ekstrak protein ditambah 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 standart protein BSA yang telah dibuat sebelumnya. Hasil penghitungan 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* ditambah *buffer loading* (Tris-Cl 0,5 M pH 6,8; SDS 10%; *glycerol* 10%; *bromophenol blue*) dan didenaturasi dengan pemanasan 100⁰C 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 V selama 5 jam dalam buffer elektoda (*glycine* 192 mM, Trisbase 25 mM, SDS 0,1%). Protein yang terpisah diwarnai dengan *Coomassie Brilliant Blue* (CBB). Protein marker menggunakan *Blue Prestained Protein Standard* sebanyak 3 μ l.

3.6 Analisa Data

Data hasil penelitian diolah dengan menggunakan *software Microsoft Excel* dan dianalisis secara deskriptif. Data hasil analisis ditampilkan dalam bentuk tabel, dan untuk mempermudah interpretasi data, dibuat grafik dan histogram.

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Aktivitas antioksidan hidrolisat protein ikan laut jenis baji-baji, bibisan dan ikan air tawar jenis wader, tawes berturut-turut memiliki % RSA sebesar 39,33%; 51,01%; 42,70% dan 53,21%. Nilai IC_{50} sebesar 1261,44 ppm; 1027,20 ppm; 1159,76 ppm dan 935,84 ppm. Nilai *reducing power* sebesar 0,501; 0,515; 0,508 dan 0,524. Komposisi asam amino pada hidrolisat protein ikan air laut jenis bibisan dan ikan air tawar jenis tawes memiliki 15 macam asam amino, diantaranya adalah asam glutamat, asam aspartat dan *lysine* dengan nilai paling tinggi berturut-turut sebesar 13,95%; 8,80%; dan 8,87% pada hidrolisat protein ikan tawes, serta 13,34%; 8,36%; dan 8,20% pada hidrolisat protein ikan bibisan. Distribusi berat molekul hidrolisat protein ikan air laut jenis bibisan memiliki nilai sebesar 20,84 kDa; 50,66 kDa, sedangkan berat molekul hidrolisat protein ikan air tawar jenis tawes sebesar 23,09 kDa; 59,08 kDa.

5.2 Saran

Diperlukan pengujian lebih lanjut mengenai urutan asam amino dalam peptida atau biasa dikenal sebagai sekuens. Dari hasil analisis sekuens dapat diketahui urutan asam amino pada hidrolisat protein ikan yang bersifat sebagai antioksidan.

DAFTAR PUSTAKA

- Akbariwati, I. 2015. “Karakteristik Fisik, Kimia, Dan Fungsional Fillet Ikan Wader (*Rasbora jacobsoni*), Bader (*Puntius javanicus*), dan Patin (*Pangasius hypophthalmus*) Akibat dari Perbedaan Teknik Preparasi”. *Skripsi*. Jember: Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember.
- Akhdiya, A. 2003. Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Protease Alkalin Termotabil. *Buletin Plasma Nutfah*. Vol. 9 (2): 38-44.
- Angraini S. 2013. “Hidrolisis Kolagen dari Kulit dan Tulang Ikan Patin (*Pangasius pangasius*) dengan Enzim Papain serta Pengujian Aktivitas Antioksidan Produk Hidrolisat yang Dihasilkan”. *Skripsi*. Indralaya: Program Studi Teknologi Hasil Perikanan. Fakultas Pertanian. Universitas Sriwijaya.
- AOAC, 2005. *Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists*. Benjamin Franklin Station, Washington.
- Ariyani, F., Saleh, M., Tazwir dan Hak, N., 2003, Optimasi Proses Produksi Hidrolisat Protein Ikan dari Mujahir (*Oreochromis mossambicus*). *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia*. Vol. (9): 11-21.
- Balti, R., Bougatef, A., Ali, N.E.H., Jellouli, K., Arroume, N.N., Dhulster, P., & Nasri, M. 2011. Comparative Study on Biochemical Properties and Antioxidative Activity of Cuttlefish (*Sepia officinalis*) Protein Hydrolysates Produced by Alcalase & Bacillus licheniformis NH1 Proteases. *Journal of Amino Acids*. 1-11.
- Belkaaloul A., Checroun A., Ait- Abdesalam A.I., Saidi D., and Kherouoa O. 2010. Growth, Acidification & Proteolysis Performance of Two co-cultures (*Lactobacillus plantarum* - *Bifidobacterium longum* and *Streptococcus thermophilus bifido - bacterium longum*). *African Journal of Biotechnology*. Vol. 9 (10): 1463-1469.
- Bhaskar N., Benila T., Radha C., Lalitha R.G. 2008. Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Visceral Waste Proteins of Catla (*Catla catla*) for Preparing Protein Hydrolysate Using a Commercial Protease. *Journal of Bioresource Technology*. Vol. 99 (10): 335-343.

- Buckle, K. A., Edwards, R. A., Fleet, G. H., and Wotton, M. 1987. *Ilmu Pangan*. Penerjemah Hari Purnomo dan Adiono. Universitas Indonesia Press. Jakarta.
- Budiharjo, A. 2002. Seleksi dan Potensi Budidaya Jenis-Jenis Ikan Wader dari Genus *Rasbora*. *Biodiversitas*. Vol. 3 (2): 225-230.
- Blois, M.S. 1958. Antioxidant Determination by The Use of A Stable Free Radical. *Nature*. Vol. (181): 1199-1299.
- Bordbar S., Ebrahimpour A., Hamid A.A., Saari N. 2013. The Improvement of the Enogenous Antioxidant Property of Stone Fish (*Actinopyga lecanora*) Tissue Using Enzymatic Proteolysis. *Journal of Food Science*. Vol (9): 15-18.
- Data Statistik Kementrian dan Perikanan. 2013. Kelautan dan perikanan dalam angka 2013. http://statistik.kkp.go.id/index.php/arsip/c/65/Kelautan-dan-perikanan-dalam-angka-2013/?category_id=3. [Diakses pada tanggal 15 Maret 2017].
- Damodaran S. 1996. Fuctional properties. Di dalam: Nakai S, Modler H.W (editor). *Food protein: Properties and characterization*. New York: UCH Publisher.
- Dávalos, A., Miguel, M., Bartolomé, B., & López-Fandiño, R. (2004). Antioxidant Activity of Peptides Derived from Egg White Proteins by Enzymatic Hydrolysis. *Journal of Food Protection*. Vol. (67): 1939–1944.
- Djumanto, Budi, S.P., dan Setyobudi, E. 2008. Perkembangan Embrio Wader Pari (*Rasbora lateristriata*) di Sungai Ngrancah Kabupaten Kulon Progo. *Prosiding Seminar Nasional Tahunan Hasil Penelitian Perikanan dan Kelautan V*. Jurusan Perikanan dan Kelautan Fakultas Pertanian UGM. Yogyakarta. 30 Juni 2008.
- Ebrahimzadeh, M.A., Pourmorad, F. dan Hafezi, S. (2008). Antioxidant Activities of Iranian Corn Silk. *Turkish Journal of Biology*. Vol. (32): 43-49.
- Ferreira I.C.F.R, Baptista P., Vilas-Boas M., dan Barros L. 2007. Free-Radical Scavenging Capacity and Reducing Power of Wild Edible Mushrooms from Northeast Portugal: Individual Cap and Stipe Activity. *Food Chemistry*. Vol. (100): 1511-1516.
- Froese, R. and D. Pauly. Editors. 2010. *Rasbora lateristriata*, Yellow Rasbora. Fish Base. World Wide Web electronic publication. <www.fishbase.org>, version (05/2010). [Akses 15 Maret 2016].

- Gaman, M. 1992. *Ilmu Pangan, Pengantar Ilmu Pangan, Nutrisi dan Mikrobiologi*. Edisi II. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Girindra A. 1993. *Biokimia 1*. Jakarta: Penerbit PT. Gramedia Pustaka Utama
- Hall, G.M and Ahmad, N.H. 1992. *Surimi and Fish Mince Product*. In: Fish Processing Tecnology. Editor: G.M. Hall. Blackie Academic & Professional. New York.
- Hanani E., Mun'im A., dan Sekarini R. 2005. Identifikasi Senyawa Antioksidan dalam Spons *Callyspongia* sp. dari Kepulauan Seribu. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. Vol. 2 (3): 127-133.
- Haslaniza, H. 2010. The Effects of Enzyme 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. (17): 147-152.
- Hermiastuti, M. 2013. "Analisis Kadar Protein dan Identifikasi Asam Amino pada Ikan Patin (*Pangasius djambal*)". *Skripsi*. Jember: Universitas Jember.
- Hidayat, T. 2005. "Pembuatan Hidrolisat Protein dari Ikan Selar Kuning (*Caranx leptolepis*) dengan Menggunakan Enzim Papain". *Skripsi*. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan: Institut Pertanian Bogor.
- Hue S.M., Boyce A.N., dan Somasundram C. 2012. Antioxidant Activity, Phenolic and Flavonoid Contents in the Leaves of Different Varieties of Sweet Potato (*Ipomoea batatas*). *Australian Journal of Crop Science*. Vol. 6 (3): 375-380.
- Ika S.A. 2011. *Studi Pembuatan Konsentrat Protein Ikan (Fish Protein Concentrate) dari Ikan Gabus (Ophiocephalus striat)*. Kementerian Pertanian: Indonesia.
- Indrayana, Y. *Ikan Wader Bintik Dua*. <http://fwfrovers.blogspot.com/2012/12/ikan-wader-bintik-dua.html>. [Akses 31 Maret 2016]
- Je, J.Y., Lee, K.H., Lee, M.H., & Ahn, C.B. (2008). Antioxidant and Antihypertensive Protein Hydrolysates Produced from Tuna Liver by Enzymatic Hydrolysis. *Food Research International*. Vol (42): 1266–1272.
- Juniarti, Delvi O., dan Yuhernita. 2009. Kandungan Senyawa Kimia, Uji Toksisitas (*Brine Shrimp Lethality Test*) dan Antioksidan (1,2-diphenyl-2-pikrilhidrazil) dari Ekstrak Daun Saga (*Abrus precatorius L.*). *Makara, Sains*. Vol. (13), No 1: 50-54.

- Karawita, R., Siriwardhana, N., Lee, K., Heo, M., Yeo, I., Lee, Y. dan Jeon, Y. (2005). Reactive Oxygen Species Scavenging, Metal Chelation, Reducing Power and Lipid Peroxidation Inhibition Properties of Different Solvent Fractions from *Hizikia fusiformis*. *European Food Research and Technology*. Vol. (220): 363-371.
- Kirk R.E., Orthmer J.B. 1953. *Encyclopedia of Chemical Technology*. Volume IX. New York: The Interscience Encyclopedia Inc.
- Klompong V., Benjakul S., Yachai M., Vissesanguan W., Shahidi F., Hayes K.D. 2009. Amino Acid Composition and Antioxidative Peptides from Protein Hydrolysate of Yellow Stripe Trevally (*Selaroides leptolepis*). *Journal Food Science*. Vol. 74 (2): 126-133.
- Kottelat, M., A.J. Whitten, S.N. Kartikasari, and S. Wirjoatmodjo. 1993. *Freshwater fishes of western Indonesia and Sulawesi*. Hongkong: Periplus edition (HK) Ltd. In collaborated with EMDI Project.
- Kristinsson, H.G., & Rasco, B.A. (2000). Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional Properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Vol. 40 (1): 43-81.
- Kuronuma, K. dan Abe, Y. 1986. *Fishes of the arabian gulf*. <http://fishbase.org> [Diakses pada tanggal 23 maret 2017].
- Laemmli U.K. 1970. Cleavage of Structural Protein During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. Vol. (227): 680-685.
- Latifah. A. 2013. "Aktivitas Antioksidan dan Komponen Bioaktif Hidrolisat Protein Jeroan Ikan Kakap Putih (*Lates calcalifer*)". *Skripsi*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Lestari, W. 2016. "Optimasi Hidrolisis Protein Ikan Wader (*Rasbora jacobsoni*) dengan Kombinasi Protease Biduri-Papain serta Penggunaan Sistein dan Gelatin" *Skripsi*. Jember: Universitas Jember.
- Lieske, E. and Myers, R. 1994. *Reef Fishes of The World*. Reprinted 1997. Periplus Edition Ltd, Hongkong.
- Luo H., Wang B., Li Z., Chi C.F., Zhang Q., He G. 2013. Preparation and Evaluation of Antioxidant Peptide from Papain Hydrolysate of *Sphyrna lewini* Muscle Protein. *Journal Food Science Technology*. Vol. 51 (1): 281-288.

- Maesen, V.D. dan Somaatmadja, 1993. *Sumberdaya Nabati Asia Tenggara I. Kacang-Kacangan*. Jakarta: Gramedia Pustaka Umum.
- Mailandari, M. 2012. “Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak daun *Garcinia kyda Roxb.* dengan Metode DPPH dan Identifikasi Senyawa Kimia Fraksi yang Aktif”. *Skripsi*. Jakarta: Universitas Indonesia.
- Maria, U. 2012. “Pendugaan Beberapa Parameter Dinamika Populasi Ikan Tawes (*Barbonymus gonionotus* Bleeker, 1850) di Danau Sindereng, Kabupaten Sindereng Rappang, Provinsi Sulawesi Selatan”. *Skripsi*. Makassar: Universitas Hassanudin.
- Mendis, E., Rajapakse, N., & Kim, S. K. (2005). Antioxidant Properties of a Radical Scavenging Peptide Purified from Enzymatically Prepared Fish Skin Gelatin Hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. (53): 581–587.
- Mine, Y. and Shahidi F. 2006. *Nutraceutical Proteins and Peptides in Health and Disease*. CRC Press. Boca Raton.
- Molyneux, P. 2004. The Use of The Stable Free Radical *Diphenylpicryl-hydrazyl* (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity, Songklanakarinn. *Journal of Science and Technology*. Vol. 26 (2): 211-21
- Muchtadi, Tien, Sugiyono, dan Fitriyono A. 2012. *Ilmu Pengetahuan Bahan Pangan*. Bandung: Alfabeta.
- Murtidjo, A. B. 2001. *Pedoman Meramu Makan Ikan*. Yogyakarta: Kanisius.
- Muthmainnah. D. 2008. *Ikan Tawes *Barnoides gonionotu**. www.brppu.com. [Akses 17 Maret 2016].
- Nelson S. Josep, 2006. *Fishes of the World*. Canada: Wiley.
- Nio, O. K. 2012. *Daftar Analisis Bahan Makanan*. Jakarta: Badan Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Oyaizu M. 1986. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japan Journal Nutrition*. Vol. (44): 307- 315.
- Park, P.J., Jung, W.K., Nam, K.S., Shahidi, F., & Kim, S.K. (2001). Purification and Characterization of Antioxidative Peptides from Protein Hydrolysate of Lecithin Free Egg Yolk. *Journal of the American Oil Chemists Society*. Vol. (78): 651–656.

- Pigot, G.M., and Tucker, B.W., 1990, Utility Fish Flesh Effectively While Maintaining Nutritional Qualities. *Seafood Effects of Technology on Nutrition.*, Marcel Decker, Inc, New York.
- Pisoschi, A.M., Cheregi, M.C., Danet, A.F., 2009. Total Antioxidant Capacity of Some Commercial Fruit Juices: Electrochemical and Spectrophotometrical Approaches. *Molecules*. Vol. (14): 480-493.
- Prakash, A. 2001. *Antioxydant activity*. Medallion Laboratories: Analithcal Progres, Vol. (19) No: 2. 1-4.
- Prior R.L., Wu X., Schaich K. 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.
- Purwandhani, L. 2015. "Penambahan Bahan Pengisi dan Variasi Teknik Pengeringan pada Pembuatan Hidrolisat Ikan Inferior Hasil Hidrolisis Enzimatis". *Skripsi*. Jember: Universitas Jember.
- Rajapakse, N., Mendis, E., Byun, H.G., & Kim, S.K. (2005). Purification and In Vitro Antioxidative Effects of Giant Squid Muscle Peptides on Free Radical-Mediated Oxidative Systems. *Journal of Nutritional Biochemistry*. Vol. (16): 562–569.
- Ranahtunga S., Rajapakse N., Kim S.K. 2006. Purification and characterization of antioxidative peptide derived from muscle of conger eel (*Conger myriaster*). *European Food Research and Technology*. Vol. 222 (12): 310-315.
- Restiani, R. 2017. Aktivitas Antioksidan Hidrolisat Protein Bungkil Nyamplung (*Calophyllum inophyllum*). Malang: Prosiding seminar nasional III tahun 2017.
- Samaranayaka A.G.P. dan Li-Chan E.C.Y. 2011. Food-Derived Peptidic Antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. *Journal of Functional Food*. Vol. (3): 229-254.
- Saputra, Y. 2006. "Petis dari Hidrolisat Beberapa Ikan Inferior". *Skripsi*. Jember: Universitas Jember
- Sari, T.N. 2015. "Karakterisasi Hidrolisat Protein Ikan Wader (*Rasbora jacobsoni*) secara Enzimatis dengan Enzim Protease dari Tanaman Biduri (*Calotropis gigantea*)". *Skripsi*. Jember: Universitas Jember.

- Schimidi, M.K., Taylor, S.L., and Nordlee, J.A., 1994, Use of Hydrolysisate-Based Products in Special Medical Diets, *Journal of Food Technology*, October 1994.
- Shahidi, F. and Naczki, M., 1995, *Food Phenolics*. Technomic pub.Co. Inc., Lancaster-Basel.
- Shimada K, Fujikawa K, Yahara K, Nakamura T. 1992. Antioxidative Properties of Xanthan on the Antioxidation of Soybean Oil in Cyclodextrin Emulsion. *Journal Agricultural Food Chemistry*. Vol. 40 (1): 945-948.
- Sugiyono. 2004. *Buku Kimia Pangan*. Yogyakarta: Universitas Negeri Yogyakarta.
- Suhartono, M.T. 1992. *Protease*. Bogor: IPB Press.
- Tatiya A.U., Tapadiya G.G., Kotecha S., dan Surana S.J. 2011. Effects of Solvents on Total Phenolics, Antioxidant and Antimicrobial Properties of *Bridelia retusa* Spreng. Stem Bark. *Indian Journal of Natural Products and Resources*. Vol. (2): 442-447.
- Underwood, A.L. and R.A. Day, Jr. 1986. *Analisa Kimia Kuantitatif*. Jakarta: Erlangga
- 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.
- Venugopal V. 2006. *Seafood Processing: Adding Value Through Quick Freezing, Retortable Packaging, and Cook-Chilling*. Boca Raton: CRC Pr.
- Wang W., de Mejia E.G. 2005. A New Frontier in Soy Bioactive Peptides that May Prevent Age-related Chronic Disease. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2005: 63-78.
- Wijayanti, A.T. 2009. "Kajian Penyaringan dan Lama Penyimpanan dalam Pembuatan Fish Pepton dari Ikan Selar Kuning (*Caranx leptolepis*)". Skripsi. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Winarno, F. G. 1993. *Enzim Pangan*. Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama.
- Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta: Penerbit Kanisius.

- Wiriyaphan, C., Chitsomboon, B., Yongsawadigul, J. 2011. Antioxydant Activity of Protein Hydrolysates Derived from Threadfin Bream Surimi Byproducts. *Journal of Food Chemistry*. Vol. (132): 104-111.
- Witono, Y., Aulanni'am, Subagio, A., dan Widjanarko, S. B. 2006. Pemurnian Parsial Enzim Protease Dari Getah Tanaman Biduri (*Calotropis gigantea*) Menggunakan Ammonium Sulphat. *Jurnal Teknologi Pertanian*. Vol. 7 (1): 20-26.
- Witono, Y., Aulanni'am, Subagio, A., Widjanarko, S. B. 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, Subagio, A. dan Widjanarko, S. B. 2007b. Karakteristik Hidrolisat Protein Kedelai Hasil Hidrolisis Protease dari Tanaman Biduri. *Berkala Penelitian Hayati*. Vol. 3 (1): 7-13.
- Witono, Y. 2009. "Spesifitas dan Stabilitas Protease Biduri (*Calotropis gigantea*)". Denpasar: Prosiding Seminar Nasional Perhimpunan Ahli Teknologi Pangan Indonesia (PATPI).
- Witono, Y., Taruna, I., Windrati, W. S., Ratna, A. 2014a. Hidrolisis Ikan Bernilai Ekonomi Rendah Secara Enzimatis Menggunakan Protease Biduri. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*. Vol. 25 (2): 140-145.
- Zaelani, A. 2012. *Kandungan Gizi pada Ikan*. <http://penyuluhankelautan.perikanan.blogspot.com/2012/06/kandungan-gizi-pada-ikan.html>. [Akses 31 Maret 2016].

LAMPIRAN A. DATA HASIL ANALISIS

A.1 Kadar protein ikan wader, tawes, baji-baji dan bibisan

Tabel A.1.1 Hasil pengukuran kadar protein (% wb)

Jenis Ikan	Kadar Protein (%)			Jumlah	Rata-rata	SD
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3			
Wader	12,50	12,58	12,60	37,68	12,56	0,053
Tawes	19,08	18,98	18,94	57,00	19,00	0,072
Baji-baji	17,80	17,84	17,94	53,58	17,86	0,072
Bibisan	18,20	18,26	18,32	54,78	18,26	0,060

A.2 Aktivitas antioksidan (Penentuan konsentrasi enzim terbaik berdasarkan %RSA tertinggi) metode DPPH (Shimada *et al.*, 1992)

Tabel A.2.1. Hasil pengukuran aktivias antioksidan %RSA

Jenis ikan	Perlakuan	Aktivitas Antioksidan (%RSA)			Jumlah	Rata-rata	SD
		Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3			
		Wader	Biduri 1%	20,87			
	Biduri 2%	30,61	32,36	31,65	94,63	31,55	0,88
	Biduri 3%	37,98	38,07	38,85	114,90	38,30	0,47
Tawes	Biduri 1%	34,82	36,14	36,52	107,49	35,83	0,89
	Biduri 2%	44,64	43,77	44,74	133,16	44,39	0,53
	Biduri 3%	50,08	49,64	49,88	149,62	49,87	0,22
Baji-baji	Biduri 1%	20,08	19,12	20,59	59,80	19,93	0,74
	Biduri 2%	25,61	27,01	27,29	79,92	26,64	0,90
	Biduri 3%	33,86	34,91	33,92	102,69	34,23	0,59
Bibisan	Biduri 1%	32,01	33,15	32,07	97,25	32,42	0,64
	Biduri 2%	35,00	35,52	36,18	106,71	35,57	0,59
	Biduri 3%	43,07	43,07	42,12	128,26	42,75	0,54

A.3 Derajat Hidrolisis (Hasnaliza *et al.*, 2010) (Penentuan konsentrasi enzim terbaik berdasarkan derajat hidrolisis tertinggi)

Tabel A.3.1. Hasil pengukuran derajat hidrolisis

Jenis ikan	Perlakuan	Derajat hidrolisis (%DH)			Jumlah	Rata-rata	SD
		Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3			
Wader	Biduri 1%	39,75	39,74	38,63	118,13	39,38	0,64
	Biduri 2%	58,87	59,05	58,87	176,81	58,94	0,10
	Biduri 3%	75,11	74,79	76,38	226,29	75,43	0,84
Tawes	Biduri 1%	42,89	41,33	43,16	127,39	42,46	0,99
	Biduri 2%	63,82	63,21	62,79	189,83	63,28	0,51
	Biduri 3%	78,53	76,97	78,45	233,95	77,99	0,87
Baji-baji	Biduri 1%	36,22	35,43	37,40	109,07	36,36	0,99
	Biduri 2%	53,86	53,86	52,91	159,97	53,33	0,48
	Biduri 3%	74,95	73,28	74,79	223,02	71,34	0,92
Bibisan	Biduri 1%	39,75	41,09	39,47	120,33	40,11	0,86
	Biduri 2%	60,63	61,51	59,77	181,91	60,64	0,86
	Biduri 3%	76,88	75,53	76,74	229,16	76,39	0,73

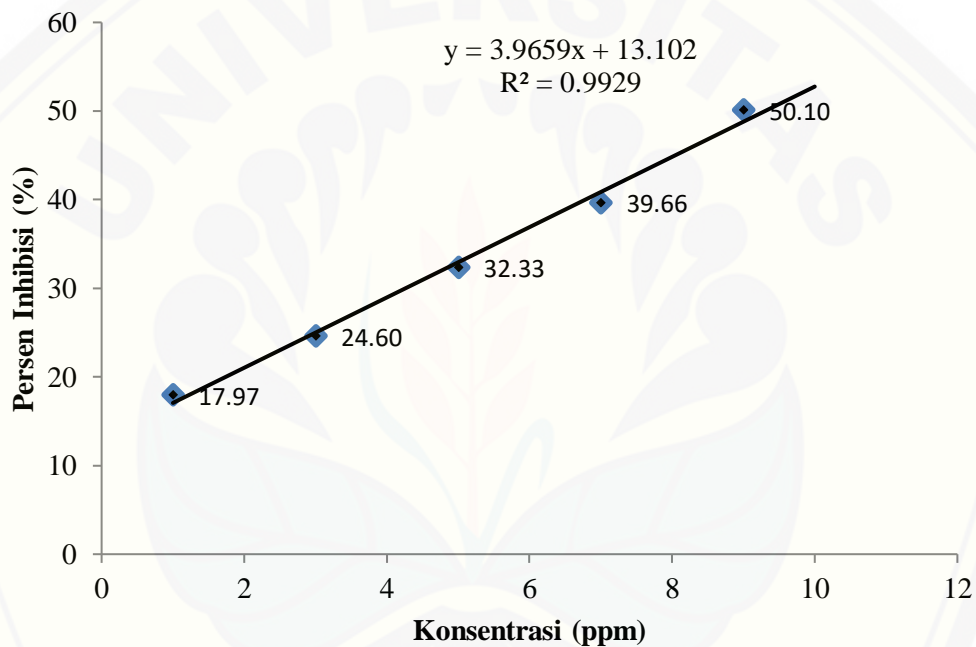
A.4. Aktivitas antioksidan hidrolisat protein ikan tahap 1 (*Freeze drying*) metode DPPH (Shimada *et al.*, 1992)

Tabel A.4.1. Hasil uji analisis aktivitas antioksidan (%RSA)

Jenis ikan	Aktivitas Antioksidan (% RSA)			Jumlah	Rata-rata	SD
	(% RSA)					
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3			
Wader	42,77	42,47	42,86	128,10	42,70	0,20
Tawes	53,91	53,14	52,59	159,65	53,21	0,66
Baji-baji	39,49	38,32	40,19	118,01	39,33	0,94
Bibisan	51,17	50,97	50,91	153,05	51,01	0,13

Tabel A.4.2. Kurva standart BHT (*Butylated hydroxytoluene*)

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi ($\lambda = 517$)			Rata-rata	% inhibisi
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3		
0	0,498	0,498	0,498	0,498	
2	0,409	0,408	0,407	0,408	17,97
4	0,376	0,375	0,374	0,375	24,60
6	0,337	0,337	0,337	0,337	32,33
8	0,301	0,300	0,299	0,300	39,66
10	0,249	0,248	0,247	0,248	50,10

Kurva Standart**Nilai IC₅₀ BHT**

$$y = 3,9659x + 13,102$$

$$50 = 3,9659x + 13,102$$

$$36,898 = 3,9659x$$

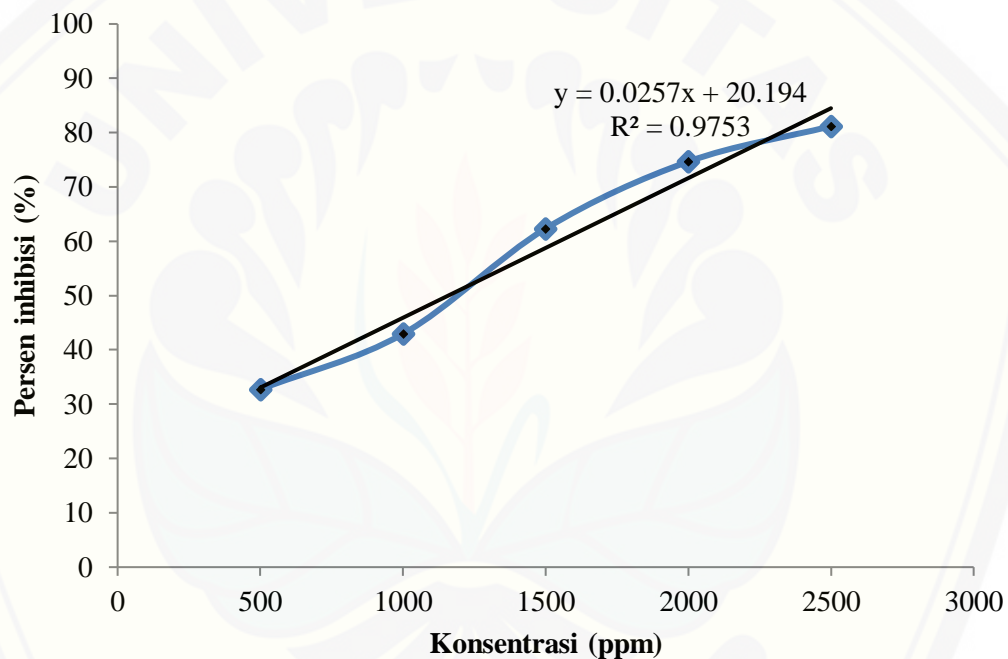
$$x = \frac{36,898}{3,9659}$$

$$x = 9,306 \text{ ppm}$$

Nilai IC₅₀ untuk BHT adalah 9,306 ppm

Tabel A.4.3 Nilai IC₅₀ pada hidrolisat protein ikan wader

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi ($\lambda = 517$)				% inhibisi
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Rata-rata	
0	0,446	0,446	0,446	0,446	
500	0,301	0,299	0,300	0,300	32,74
1000	0,255	0,254	0,253	0,254	42,94
1500	0,169	0,167	0,168	0,168	62,33
2000	0,113	0,113	0,113	0,113	74,66
2500	0,085	0,083	0,084	0,084	81,17

**Nilai IC₅₀ Hidrolisat ikan wader**

$$y = 0,0257x + 20,194$$

$$50 = 0,0257x + 20,194$$

$$20,194 = 0,0257x$$

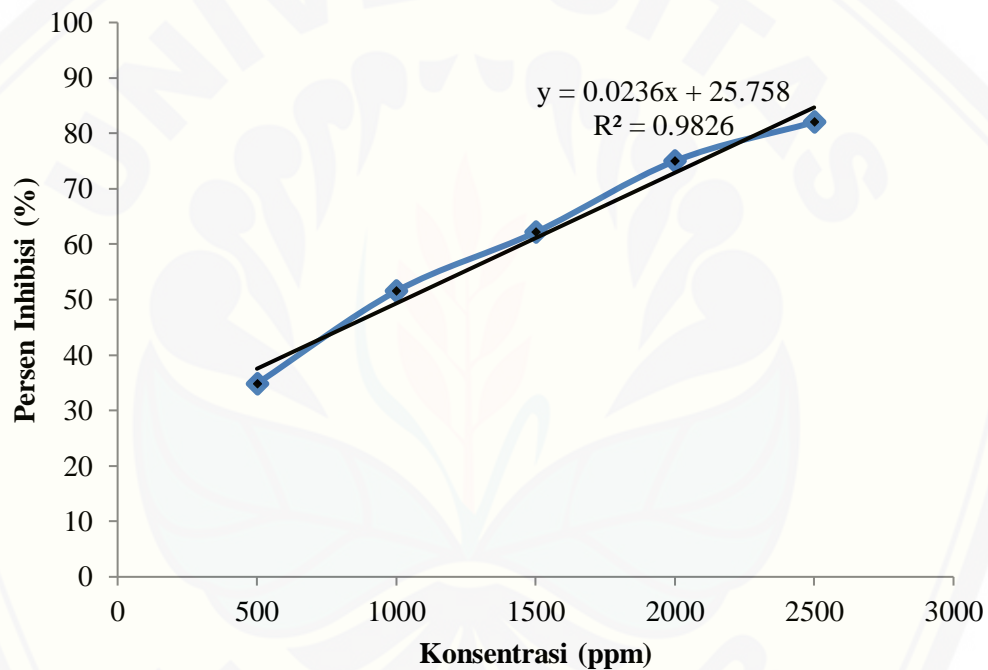
$$x = \frac{20,194}{0,0257}$$

$$x = 1159,76 \text{ ppm}$$

Nilai IC₅₀ untuk Hidrolisat Protein ikan wader adalah 1159,76 ppm

Tabel A.4.4 Nilai IC₅₀ pada hidrolisat protein ikan bibisan

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi ($\lambda = 517$)			Rata-rata	% inhibisi
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3		
0	0,462	0,462	0,462	0,462	
500	0,301	0,301	0,301	0,301	34,85
1000	0,223	0,225	0,224	0,224	51,52
1500	0,161	0,161	0,161	0,161	65,15
2000	0,140	0,139	0,138	0,139	75,00
2500	0,091	0,089	0,090	0,090	82,03

**Nilai IC₅₀ Hidrolisat ikan bibisan**

$$y = 0,0236x + 25,758$$

$$50 = 0,0236x + 25,758$$

$$25,758 = 0,0236x$$

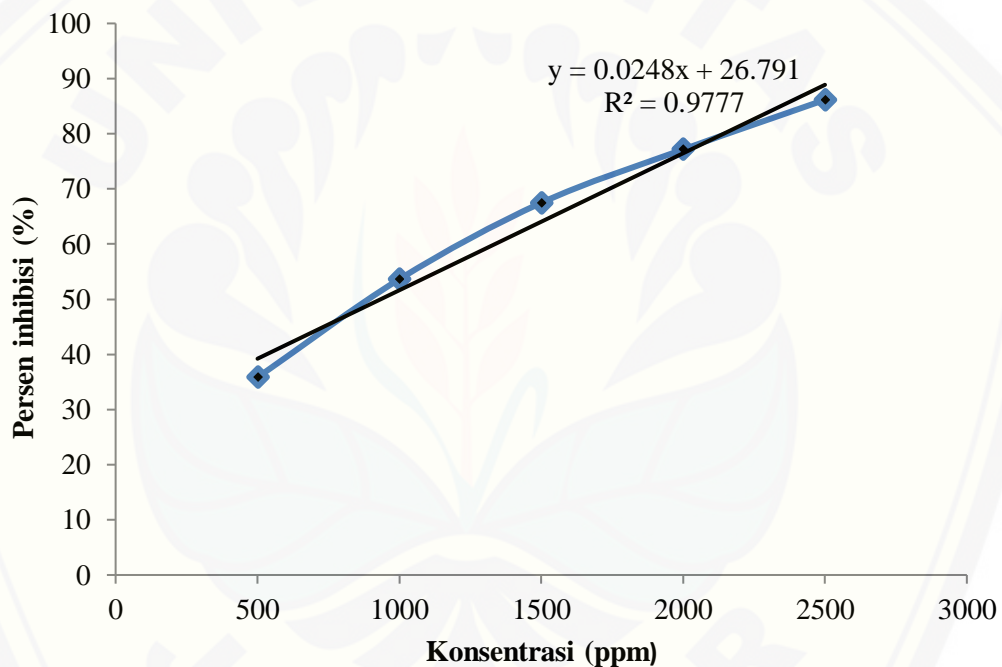
$$x = \frac{25,758}{0,0236}$$

$$x = 1027,20 \text{ ppm}$$

Nilai IC₅₀ untuk Hidrolisat Protein Ikan Bibisan adalah 1027,20 ppm

Tabel A.4.5 Nilai IC₅₀ pada hidrolisat protein ikan tawes

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi ($\lambda = 517$)			Rata-rata	% inhibisi
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3		
0	0,455	0,455	0,455	0,455	
500	0,293	0,291	0,292	0,292	35,82
1000	0,211	0,211	0,211	0,211	53,63
1500	0,149	0,147	0,148	0,148	67,47
2000	0,104	0,104	0,104	0,104	77,14
2500	0,065	0,061	0,063	0,063	86,15

**Nilai IC₅₀ Hidrolisat ikan tawes**

$$y = 0,0248x + 26,791$$

$$50 = 0,0248x + 26,791$$

$$23,209 = 0,0248x$$

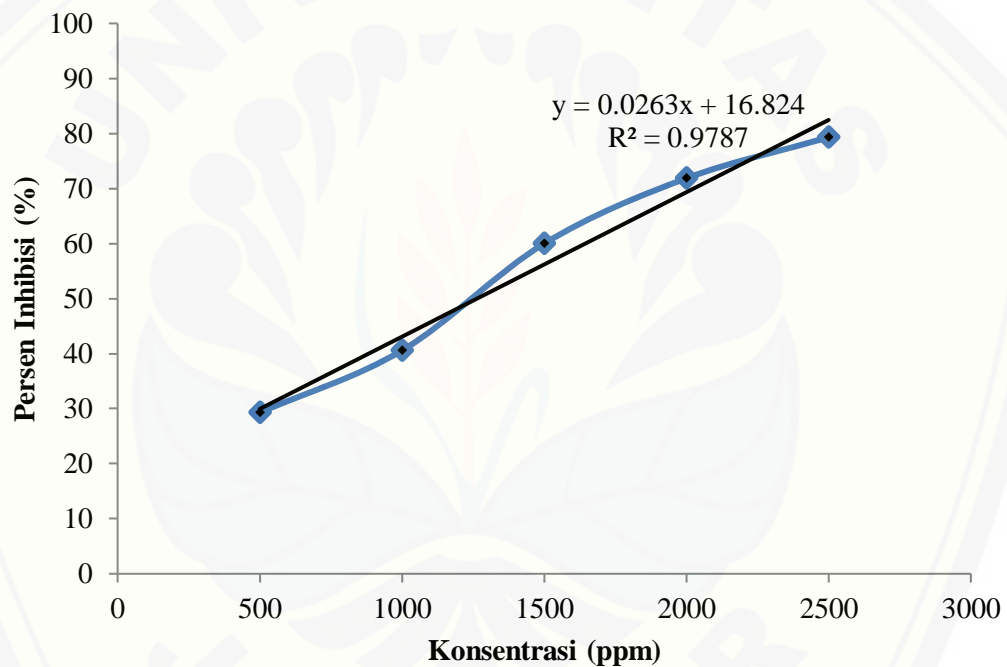
$$x = \frac{23,209}{0,0248}$$

$$x = 935,84 \text{ ppm}$$

Nilai IC₅₀ untuk Hidrolisat Protein Ikan Tawes adalah 935,84 ppm

Tabel A.4.6 Nilai IC₅₀ pada hidrolisat protein ikan baji-baji

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi ($\lambda = 517$)			Rata-rata	% inhibisi
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3		
0	0,430	0,430	0,430	0,430	
500	0,305	0,304	0,303	0,304	29,19
1000	0,255	0,256	0,254	0,254	40,58
1500	0,172	0,172	0,172	0,172	60,00
2000	0,121	0,121	0,121	0,121	71,86
2500	0,089	0,089	0,089	0,089	79,30

**Nilai IC₅₀ Hidrolisat ikan baji-baji**

$$y = 0,0263x + 16,824$$

$$50 = 0,0263x + 16,824$$

$$26,824 = 0,0263x$$

$$x = \frac{26,824}{0,0263}$$

$$x = 1261,44\text{ppm}$$

Nilai IC₅₀ untuk Hidrolisat Protein Ikan Baji-Baji adalah 1261,44 ppm

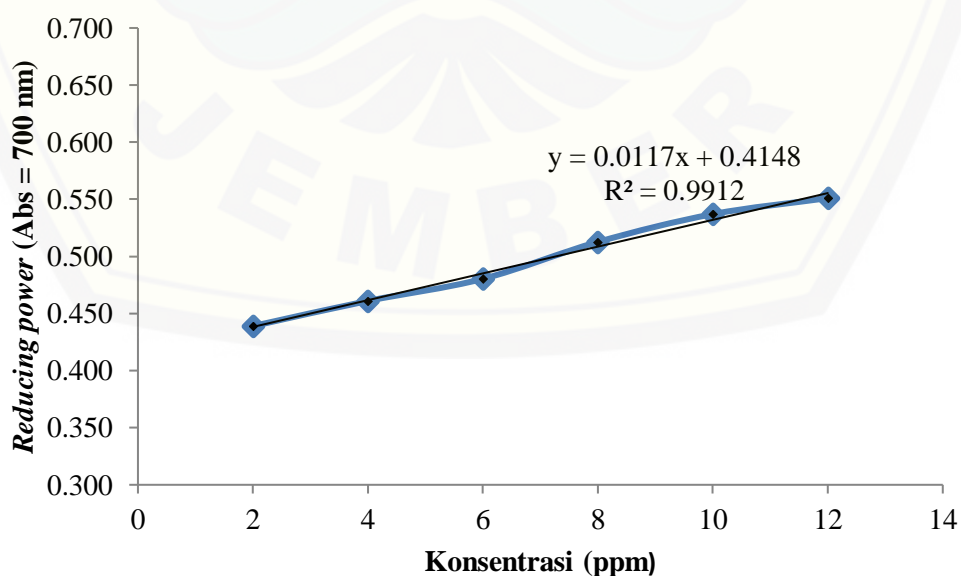
A.5. Aktivitas antioksidan hidrolisat protein ikan tahap II (*Freeze drying*) metode *Reducing power* (Oyaizu, 1986)

Tabel A.5.1. Hasil uji analisis aktivitas antioksidan hidrolisat protein ikan metode *reducing power*

Jenis ikan	Absorbansi ($\lambda = 700 \text{ nm}$)			Rata-rata	SD
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3		
Blanko	0,422	0,422	0,422	0,422	
Wader	0,509	0,507	0,509	0,508	0,001
Tawes	0,522	0,526	0,523	0,524	0,002
Baji-baji	0,500	0,500	0,503	0,501	0,002
Bibisan	0,514	0,515	0,516	0,515	0,001

Tabel A.5.2. Kurva standart Asam askorbat

No	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi ($\lambda = 700 \text{ nm}$)			Rata-rata
		Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	
1	0	0,422	0,422	0,422	0,422
2	2	0,439	0,440	0,438	0,439
3	4	0,461	0,462	0,460	0,461
4	6	0,481	0,480	0,480	0,480
5	8	0,513	0,513	0,512	0,513
6	10	0,537	0,538	0,536	0,537
7	12	0,552	0,551	0,550	0,551



A.6. Komposisi Asam Amino

Tabel A.6.1 Komposisi Asam Amino Hidrolisat protein ikan tawes

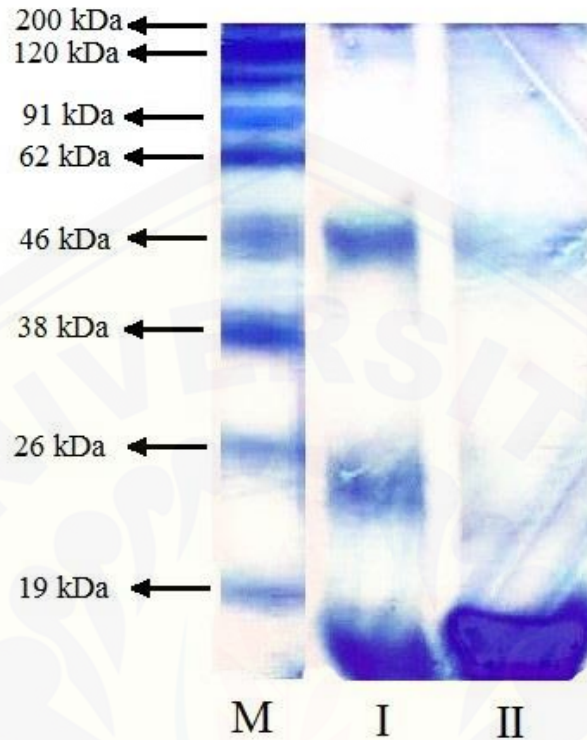
No.	Parameter	Result	Unit	Method
1	L-aspartic acid	8,80	% w/w	IK.LP-04.7-LT-1.0 (HPLC)
2	L-glutamic acid	13,95	% w/w	IK.LP-04.7-LT-1.0 (HPLC)
3	L-serine	3,48	% w/w	IK.LP-04.7-LT-1.0 (HPLC)
4	L-histidine	2,24	% w/w	IK.LP-04.7-LT-1.0 (HPLC)
5	Glycine	5,30	% w/w	IK.LP-04.7-LT-1.0 (HPLC)
6	L-threonine	3,90	% w/w	IK.LP-04.7-LT-1.0 (HPLC)
7	L-arginine	5,74	% w/w	IK.LP-04.7-LT-1.0 (HPLC)
8	L-alanine	5,82	% w/w	IK.LP-04.7-LT-1.0 (HPLC)
9	L-tyrosine	2,79	% w/w	IK.LP-04.7-LT-1.0 (HPLC)
10	L-methionine	2,93	% w/w	IK.LP-04.7-LT-1.0 (HPLC)
11	L-valine	4,06	% w/w	IK.LP-04.7-LT-1.0 (HPLC)
12	L-phenylalalanine	3,75	% w/w	IK.LP-04.7-LT-1.0 (HPLC)
13	L-isoleucine	3,74	% w/w	IK.LP-04.7-LT-1.0 (HPLC)
14	L-leucine	7,01	% w/w	IK.LP-04.7-LT-1.0 (HPLC)
15	L-lysine	8,87	% w/w	IK.LP-04.7-LT-1.0 (HPLC)

Tabel A.6.2 Komposisi Asam Amino Hidrolisat protein ikan bibisan

No.	Parameter	Result	Unit	Method
1	L-aspartic acid	8,36	% w/w	IK.LP-04.7-LT-1.0 (HPLC)
2	L-glutamic acid	13,34	% w/w	IK.LP-04.7-LT-1.0 (HPLC)
3	L-serine	3,09	% w/w	IK.LP-04.7-LT-1.0 (HPLC)
4	L-histidine	1,62	% w/w	IK.LP-04.7-LT-1.0 (HPLC)
5	Glycine	4,35	% w/w	IK.LP-04.7-LT-1.0 (HPLC)
6	L-threonine	3,64	% w/w	IK.LP-04.7-LT-1.0 (HPLC)
7	L-arginine	5,22	% w/w	IK.LP-04.7-LT-1.0 (HPLC)
8	L-alanine	5,69	% w/w	IK.LP-04.7-LT-1.0 (HPLC)
9	L-tyrosine	2,39	% w/w	IK.LP-04.7-LT-1.0 (HPLC)
10	L-methionine	2,76	% w/w	IK.LP-04.7-LT-1.0 (HPLC)
11	L-valine	3,80	% w/w	IK.LP-04.7-LT-1.0 (HPLC)
12	L-phenylalalanine	3,35	% w/w	IK.LP-04.7-LT-1.0 (HPLC)
13	L-isoleucine	3,37	% w/w	IK.LP-04.7-LT-1.0 (HPLC)
14	L-leucine	6,57	% w/w	IK.LP-04.7-LT-1.0 (HPLC)
15	L-lysine	8,20	% w/w	IK.LP-04.7-LT-1.0 (HPLC)

A.7 Berat molekul protein

A.7.1 Hasil uji elektroforesis SDS-PAGE pada hidrolisat protein ikan



Keterangan : M = Marker
 I = Hidrolisat protein ikan tawes
 II = Hidrolisat protein ikan bibisan

Tabel A.7.1 Tabel Log BM

Protein Marker	BM (kDa)	Jarak tracking (cm)	Log (BM)	RF
I	200	0,05	2,30103	0,00675
II	120	0,65	2,07918	0,08783
III	91	1,05	1,95904	0,14189
IV	62	1,49	1,79239	0,20135
V	46	2,40	1,66275	0,32432
VI	38	3,45	1,57978	0,46621
VII	26	4,78	1,41497	0,64594
VIII	19	6,45	1,27875	0,87162

Panjang separating gel = 7,40 cm

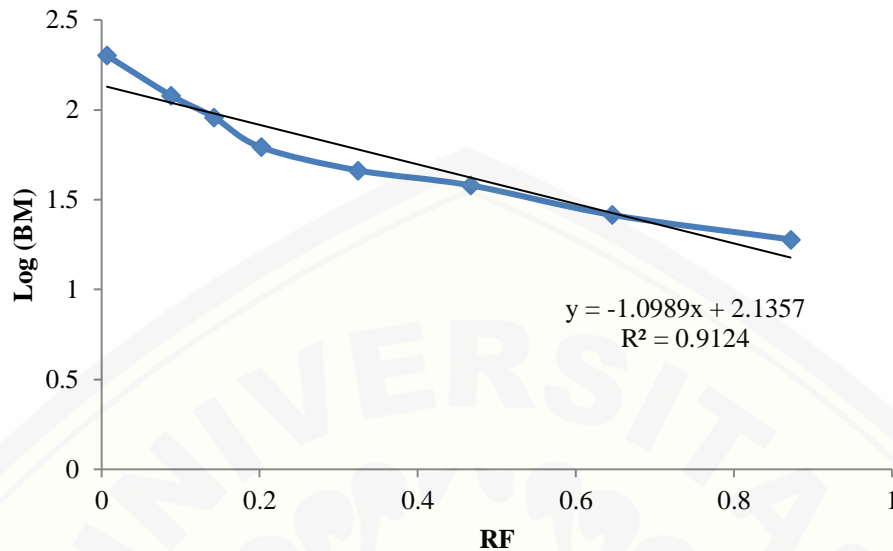
A. RF Marker

- $RF_1 = \frac{\text{Panjang pita 1}}{\text{Panjang separating gel}} = \frac{0,05}{7,40} = 0,00675$
- $RF_2 = \frac{\text{Panjang pita 2}}{\text{Panjang separating gel}} = \frac{0,65}{7,40} = 0,08783$
- $RF_3 = \frac{\text{Panjang pita 3}}{\text{Panjang separating gel}} = \frac{1,05}{7,40} = 0,14189$
- $RF_4 = \frac{\text{Panjang pita 4}}{\text{Panjang separating gel}} = \frac{1,49}{7,40} = 0,20135$
- $RF_5 = \frac{\text{Panjang pita 5}}{\text{Panjang separating gel}} = \frac{2,40}{7,40} = 0,32432$
- $RF_6 = \frac{\text{Panjang pita 6}}{\text{Panjang separating gel}} = \frac{3,45}{7,40} = 0,46621$
- $RF_7 = \frac{\text{Panjang pita 7}}{\text{Panjang separating gel}} = \frac{4,78}{7,40} = 0,64594$
- $RF_8 = \frac{\text{Panjang pita 8}}{\text{Panjang separating gel}} = \frac{6,45}{7,40} = 0,87162$

B. RF Sampel

- $RF_{(\text{Tawes})} = \frac{\text{Panjang pita sampel}}{\text{Panjang separating gel}} = \frac{2,45}{7,40} = 0,33108$
- $RF_{(\text{Tawes})} = \frac{\text{Panjang pita sampel}}{\text{Panjang separating gel}} = \frac{5,20}{7,40} = 0,70270$
- $RF_{(\text{Bibisan})} = \frac{\text{Panjang pita sampel}}{\text{Panjang separating gel}} = \frac{2,9}{7,40} = 0,39189$
- $RF_{(\text{Bibisan})} = \frac{\text{Panjang pita sampel}}{\text{Panjang separating gel}} = \frac{5,50}{7,40} = 0,74324$

Kurva Log BM



Perhitungan berat molekul hidrolisat protein ikan tawes

- RF(sampel) = x y = log BM
 $y = -1,098x + 2,135$ BM = anti log y
 $y = -1,098 (0,33108) + 2,135$ BM = anti log 1,77147
 $y = 1,77147$ BM = 59,08 kDa
- RF(sampel) = x y = log BM
 $y = -1,098x + 2,135$ BM = anti log y
 $y = -1,098 (0,70270) + 2,135$ BM = anti log 1,363432
 $y = 1,363432$ BM = 23,09 kDa

Perhitungan berat molekul hidrolisat ikan bibisan

- RF(sampel) = x y = log BM
 $y = -1,098x + 2,135$ BM = anti log y
 $y = -1,098 (0,39189) + 2,135$ BM = anti log 1,704703
 $y = 1,704703$ BM = 50,6643 kDa

- $RF(\text{sampel}) = x$
 $y = -1,098x + 2,135$
 $y = -1,098(0,74324) + 2,135$
 $y = 1,318919$
- $y = \log BM$
 $BM = \text{anti log } y$
 $BM = \text{anti log } 1,318919$
 $BM = 20,84 \text{ kDa}$



LAMPIRAN B. PEMBUATAN BAHAN KIMIA

B.1. Bahan kimia pada analisis derajat hidrolisis (Hasnaliza *et al.*, 2010) dan kadar protein

1. TCA 20%

Pembuatan larutan TCA 20% dilakukan dengan cara melarutkan 20 gram TCA dengan aquades dalam labu takar 100 ml hingga batas tera. Larutan TCA digunakan pada analisis derajat hidrolisis.

2. Asam borat 4%

Pembuatan larutan asam borat 4% dilakukan dengan cara melarutkan 4 gram asam borat dengan aquades dalam labu takar 100 ml hingga batas tera. Dalam proses pelarutan menggunakan stirer.

3. NaOH 40%

Pembuatan larutan NaOH 40% dilakukan dengan cara melarutkan 40 gram NaOH dengan aquades dalam labu takar 100 ml hingga batas tera.

4. HCl 0,1 N

Pembuatan larutan HCl 0,1 N dilakukan dengan cara melarutkan 0,83 ml HCl dengan aquades dalam labu takar 100 ml hingga batas tera. Penneraan dilakukan dalam ruang asam.

B.2 Bahan kimia pada 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 0,0039 gram DPPH dengan etanol p.a dalam labu takar 100 ml hingga batas tera.

2. Kurva standart BHT

Pembuatan kurva standart 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 diambil sejumlah volume dalam perhitungan dibawah ini ditambahkan etanol p.a dalam labu tera 10 ml hingga batas tera.

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

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

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

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

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

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

3. Larutan sampel hidrolisat protein ikan

Hidrolisat protein ikan dilakukan pengenceran berbagai konsentrasi untuk menghitung nilai IC_{50} . Pembuatan larutan hidrolisat protein diawali dengan pembuatan larutan induk 3000 ppm. Sebanyak 30 mg hidrolisat protein dilarutkan dengan etanol 97% dalam labu takar 10 ml hingga batas tera. Kemudian larutan induk diambil sejumlah volume dalam perhitungan dibawah ini ditambahkan etanol 97% dalam labu tera 10 ml hingga batas tera.

a. Larutan sampel 2500 ppm

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

$$3000 \text{ ppm} \times V_1 = 2500 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}$$

$$V_1 = (2500 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}) / 3000 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 25000 \text{ ml} / 3000$$

$$V_1 = 8,33 \text{ ml}$$

b. Larutan sampel 2000ppm

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

$$2500 \text{ ppm} \times V_1 = 2000 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}$$

$$V_1 = (2000 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}) / 2500 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 20000 \text{ ml} / 2500$$

$$V_1 = 8 \text{ ml}$$

c. Larutan sampel 1500ppm

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

$$2000 \text{ ppm} \times V_1 = 1500 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}$$

$$V_1 = (1500 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}) / 2000 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 15000 \text{ ml} / 2000$$

$$V_1 = 7,5 \text{ ml}$$

d. Larutan sampel 1000 ppm

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

$$1500 \text{ ppm} \times V_1 = 1000 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}$$

$$V_1 = (1000 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}) / 1500 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 10000 \text{ ml} / 1500$$

$$V_1 = 6,67 \text{ ml}$$

e. Larutan sampel 500 ppm

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

$$1000 \text{ ppm} \times V_1 = 500 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}$$

$$V_1 = (500 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}) / 1000 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 5000 \text{ ml} / 1000$$

$$V_1 = 5 \text{ ml}$$

B.3 Bahan kimia pada analisis aktivitas antioksidan metode *reducing power* (Oyaizu, 1986)

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

Pembuatan larutan buffer fosfat 0,2 M pH 6,6 dilakukan dengan cara melarutkan 2,78 gram NaH_2PO_4 dengan aquades dalam labu takar 100 ml hingga batas tera (larutan A). Larutan B dibuat dengan cara melarutkan 5,265 gram Na_2HPO_4 dengan aquades 100 ml hingga batas tera. Larutan A kemudian dilakukan pengambilan sebanyak 62,5 ml dan larutan B sebanyak 37,5. Kedua larutan dihomogenkan dan dilakukan penambahan aquades hingga mencapai volume 200 ml.

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

Pembuatan larutan *potassium ferricyanide* dilakukan dengan cara melarutkan 1 gram $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ dengan aquades dalam labu takar 100 ml hingga batas tera.

3. Larutan TCA 10%

Pembuatan larutan TCA 10% diawali dengan cara melarutkan 10 gram TCA dengan aquades dalam labu takar 100 ml hingga batas tera.

4. Larutan FeCl_3 0,1%

Pembuatan larutan FeCl_3 dilakukan dengan cara melarutkan 0,11 gram FeCl_3 dengan aquades dalam labu takar 100 ml hingga batas tera.

B.4 Bahan kimia pada analisis komposisi asam amino menggunakan HPLC (AOAC, 2005)

1. *Ortoftalaldehida* (OPA)

Pembuatan pereaksi *Ortoftalaldehida* (OPA) dilakukan dengan cara melarutkan 50 mg OPA dalam 4 ml metanol dan ditambahkan *merkptoetanol*. Campuran dikocok dengan hati-hati kemudian ditambahkan dengan larutan brij-30 dan buffer borat pH 10,4. Larutan stok disimpan dalam botol berwarna gelap pada suhu 4⁰C selama 2 minggu agar larutan stabil. Pereaksi derivatisasi dibuat dengan cara mencampurkan satu bagian larutan stok dengan dua bagian bufer kalium borat pH 10,4 dan dibuat baru setiap hari.

2. HCl 6 N

Pembuatan larutan HCl 6 N dilakukan dengan cara melarutkan 49,75 ml HCl dengan aquades dalam labu takar 100 ml hingga batas tera. Peneraan dilakukan dalam ruang asam.

3. HCl 0,01 N

Pembuatan larutan HCl 0,01 N dilakukan dengan cara melarutkan 0,083 ml HCl dengan aquades dalam labu takar 100 ml hingga batas tera. Peneraan dilakukan dalam ruang asam.

4. Fase gerak

Buffer A: Bufer A terdiri dari Na-asetat, Na EDTA, THF (*Tetrahidrofuran*) yang dilarutkan dalam 1 liter air *Hi Pure* (H.P.). Bufer disaring menggunakan kertas saring milipori 0,5 mikron yang stabil selama 5 hari pada suhu kamar.

Buffer B: Bufer B terdiri dari metanol 95% dalam air *Hi Pure* dan dalam pembuatannya disaring dengan kertas saring milipori 0,45 mikron.

B.5 Bahan kimia pada analisis berat molekul protein SDS-PAGE (Laemlii, 1970)

1. Buffer ekstraksi

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

Pembuatan larutan EDTA 1 mM dilakukan dengan cara melarutkan 0,037 gram EDTA dengan aquades dalam labu takar 100 ml hingga batas tera.

b. MgCl 10 mM

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

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

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

2. Reagen Bradford

Commasive Blue sebanyak 0,01 gram dilarutkan ke dalam 5 ml etanol 95% ditambah asam fosfor 85% sebanyak 10 ml, kemudian di saring dengan menggunakan kertas saring dan disimpan dalam botol gelap pada suhu rendah. Saat hendak akan digunakan maka harus dilakukan pengenceran sebanyak lima kali. (Bradford, 1976).

3. Buffer Loading

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

Pembuatan larutan Tris-Cl 0,5 M pH 6,8 diawali dengan melarutkan 6 gram basa tris dalam 60 ml air deionisasi dan dilakukan pengadukan. pH disesuaikan hingga 6,8 dengan menambahkan HCl 6 N, dan dilakukan peneraan hingga volume 100 ml. Lrutan disimpan pada suhu 4⁰C

b. SDS 10% (w/v)

Pembuatan SDS (*Sodium Dodecyl Sulphate*) 10 % dibuat dengan cara melarutkan 10 gram SDS dalam 90 ml air deionisasi, kemudian dilakukan pengadukan dengan hati-hati. Setelah homogen kemudian dilakukan peneraan hingga volume 100 ml.

c. *Glycerol* 10%

Pembuatan larutan *Glycerol* 10% dilakukan dengan cara melarutkan 10 ml Gliserol dengan aquades dalam labu takar 100 ml hingga batas tera.

d. *Bromophenol blue*

Pembuatan 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.

5. *Acrylamide* 15%

Pembuatan *acrylamide* 15% diawali 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 di homogenisasi menggunakan stirer dan disaring. Larutan disimpan pada suhu 40C di tempat yang terhindar dari cahaya. Larutan dapat disimpan maksimal 30 hari sebelum digunakan.

6. Buffer elektroda

a. *Glycine* 192 mM

Pembuatan larutan *Glycine* 192 mM dilakukan dengan cara melarutkan 1,44 gram *Glycine* dengan aquades dalam labu takar 100 ml hingga batas tera.

b. Trisbase 25 Mm

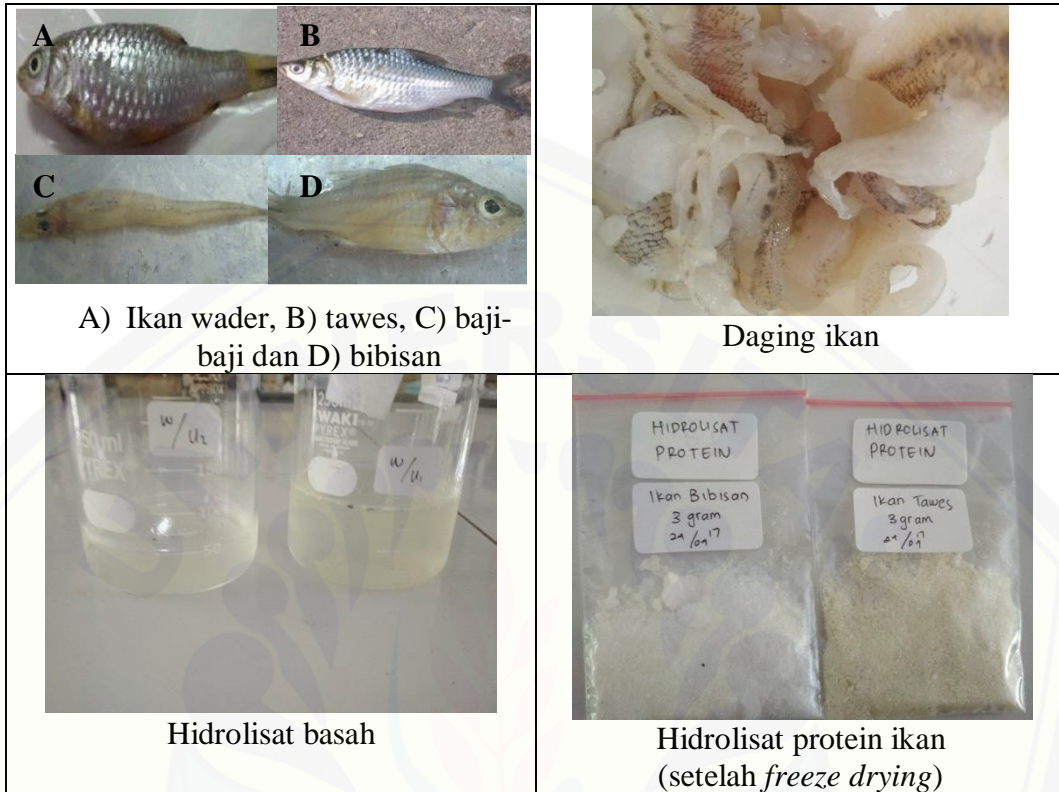
Pembuatan larutan basa tris 25 mM dilakukan dengan cara melarutkan 0,3 gram Tris dengan aquades dalam labu takar 100 ml hingga batas tera.

c. SDS 0,1 %

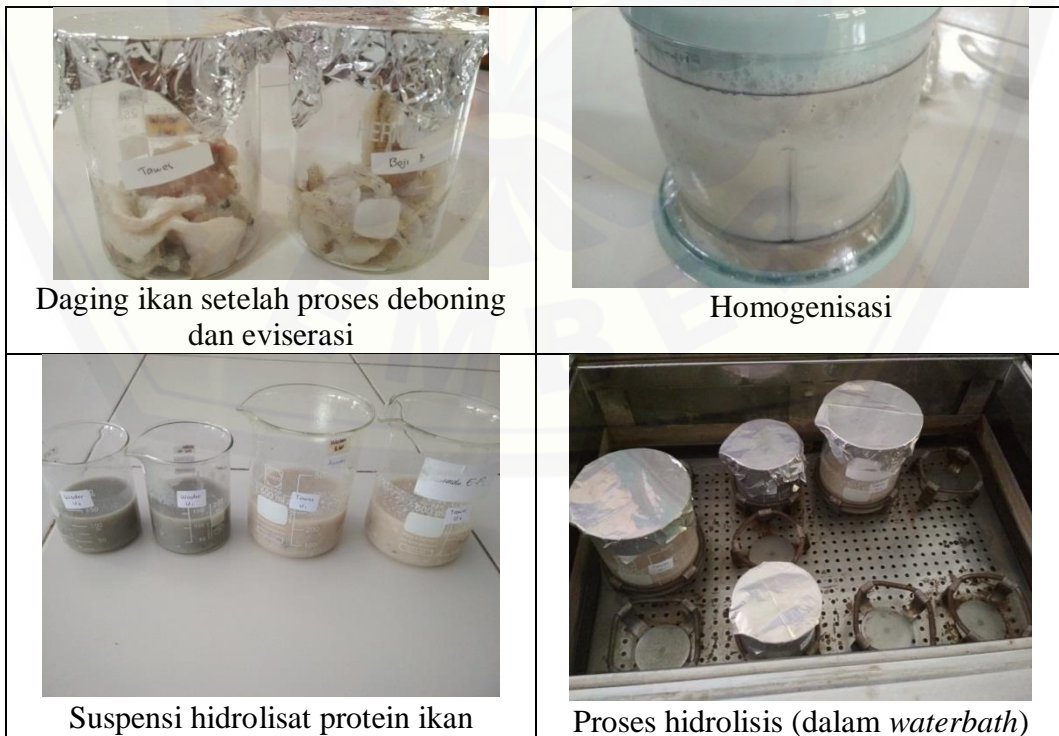
Pembuatan SDS (*Sodium Dodecyl Sulphate*) 0,1 % dibuat dengan cara melarutkan 0,1 gram SDS dalam 90 ml air deionisasi, kemudian dilakukan pengadukan dengan hati-hati. Setelah homogen kemudian dilakukan peneraan hingga volume 100 ml.

LAMPIRAN C. DOKUMENTASI

C.1 Dokumentasi bahan baku dan produk hidrolisat protein



C.2 Tahapan produksi hidrolisat protein ikan





Sentrifugasi

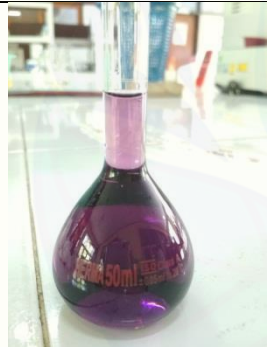


Supernatan hidrolisat protein



Pengeringan dengan *freeze drying*

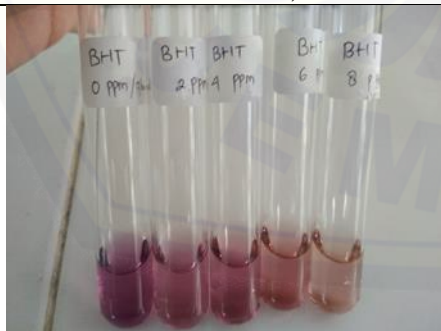
C.3 Pengujian aktivitas antioksidan hidrolisat protein ikan (metode DPPH)



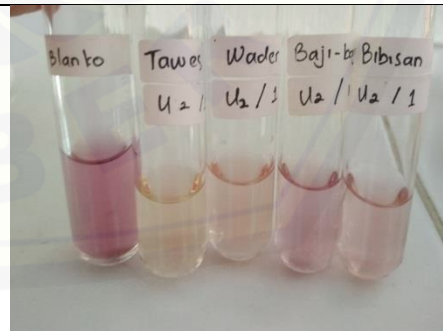
Larutan DPPH 0,1 mM



Larutan seri BHT 0-8 ppm



BHT 0-8 ppm



Hasil uji antioksidan (%RSA) sampel hidrolisat protein



Pengujian IC₅₀ hidrolisat protein ikan wader



Pengujian IC₅₀ hidrolisat protein ikan tawes



Pengujian IC₅₀ hidrolisat protein ikan bibisan

C.4 Pengujian aktivitas antioksidan hidrolisat protein ikan (metode *reducing power*)



Larutan FeCl 0,1%



Larutan Kalium Ferricyanide 0,1%



Larutan seri asam askorbat 2 – 12 ppm



Hasil analisa reducing power asam askorbat 2 – 12 ppm



Pengujian *reducing power* pada hidrolisat protein ikan

C.5 Pengujian derajat hidrolisis



Hidrolisat protein ikan setelah penambahan TCA



Proses destruksi protein di ruang asam



Proses destilasi menggunakan mesin destilator



Sampel setelah dilakuan titrasi