



**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN HASIL HIDROLISIS ENZIMATIS
PROTEIN IKAN WADER (*Rasbora Joacibsoni*) MENGGUNAKAN
KOMBINASI CALOTROPIN DAN PAPAIN**

SKRIPSI

Oleh:

Kinanti Cahyaningati

NIM 151710101070

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

2019



**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN HASIL HIDROLISIS ENZIMATIS
PROTEIN IKAN WADER (*Rasbora Jacobsoni*) MENGGUNAKAN
KOMBINASI CALOTROPIN DAN PAPAIN**

SKRIPSI

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

Oleh:

Kinanti Cahyaningati

NIM 151710101070

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

2019

PERSEMBAHAN

Karya tulis ini saya persembahkan kepada :

1. Allah Subahanahu Wata'ala yang telah memberikan keridhoan, kemudahan, kekuatan, ketenangan dan kelancranNya selama menyelesaikan tugas akhir ini;
2. Kedua orang tuaku yang sangat amat saya sayangi dan cintai, Bapak Nanang Arisona dan Ibu Mardiana Rahmawati yang selalu mendoakan, memberi semangat, dan berusaha memberikan yang terbaik untukku;
3. Adikku Puti Ilalang Sunyi serta seluruh keluarga besarku yang selalu memberi semangat, mendukung dan selalu memberi motivasi selama ini;
4. Seluruh guruku dari taman kanak-kanak hingga dosen di perguruan tinggi yang sangat saya hormati dan hargai usahanya dalam mendidik dan memberi semangat dengan penuh kesabaran dan ketulusan;
5. Jajaran Dekanat Fakultas Teknologi Pertanian;
6. Teman-teman FTP 2015 yang telah bersama-sama berjuang dan belajar selama 4 tahun ini;
7. Teman-teman seperjuangan THP-A 2015 yang selalu berbagi semangat, keceriaan, dan cinta kasih persahabatan selama kuliah 4 tahun ini;
8. Almamater yang selalu aku banggakan, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember

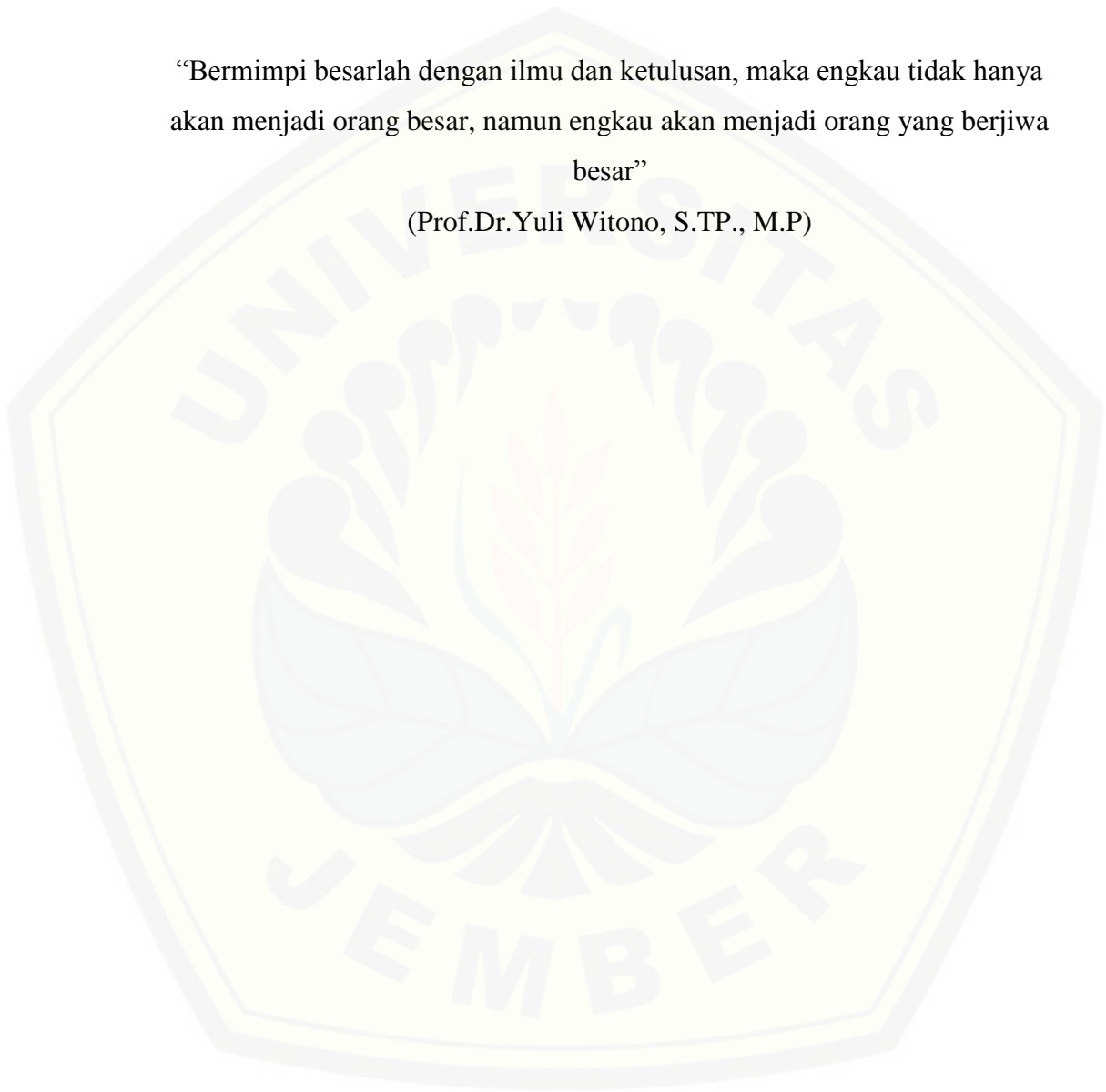
MOTO

“Dan Allah pemberi Rezeki yang terbaik”

(QS. Al-Jumuah 62:11)

“Bermimpi besarlah dengan ilmu dan ketulusan, maka engkau tidak hanya akan menjadi orang besar, namun engkau akan menjadi orang yang berjiwa besar”

(Prof.Dr.Yuli Witono, S.TP., M.P)



PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

nama : Kinanti Cahyaningati

NIM : 151710101070

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Aktivitas Antioksidan Hasil Hidrolisis Enzimatis Protein Ikan Wader (*Rasbora Jacobsoni*) Menggunakan Kombinasi Calotropin dan Papain” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan disebutkan sumbernya dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya tiruan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, 25 Juli 2019

Yang menyatakan,

Kinanti Cahyaningati

NIM 151710101070

SKRIPSI

**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN HASIL HIDROLISIS ENZIMATIS
PROTEIN IKAN WADER (*Rasbora Jacobsoni*) MENGGUNAKAN
KOMBINASI CALOTROPIN DAN PAPAIN**

Oleh:

Kinanti Cahyaningati

NIM 151710101070

Pembimbing

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

Dosen Pembimbing Anggota : Ardiyan Dwi Masahid., S.TP., M.P

LEMBAR PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Aktivitas Antioksidan Hasil Hidrolisis Enzimatis Protein Ikan Wader (*Rasbora Jacobsoni*) Menggunakan Kombinasi Calotropin dan Papain”, karya Kinanti Cahyaningati (151710101070), telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember pada :

hari, tanggal :

tempat : Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama

Dosen Pembimbing Anggota

Prof. Dr. Yuli Witono, S.TP.,MP
NIP. 196912121998022001

Ardiyani Dwi Masahid, S.TP.,MP
NIP. 760016797

Tim Penguji

Ketua,

Anggota,

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

Dr. Triana Lindriati, S.T., M.P
NIP. 196808141998032001

Mengesahkan
Dekan Fakultas Teknologi Pertanian
Universitas Jember

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

RINGKASAN

Aktivitas Antioksidan Hasil Hidrolisis Enzimatis Protein Ikan Wader (*Rasbora jacobsoni*) Menggunakan Kombinasi Calotropin dan Papain; Kinanti Cahyaningati, 151710101070; 2019; 44 halaman; Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.

Ikan wader adalah salah satu jenis ikan air tawar yang melimpah dan memiliki harga murah namun pemanfaatannya belum optimal. Pengolahan ikan wader menjadi hidrolisat protein ikan merupakan salah satu cara meningkatkan nilai komersial dari wader. Hidrolisat protein ikan merupakan produk yang dihasilkan dari penguraian protein ikan menjadi peptida sederhana dan asam amino melalui proses hidrolisis oleh enzim. Hidrolisis secara enzimatis dapat dilakukan dengan menggunakan jenis enzim protease seperti enzim calotropin dan enzim papain. Berdasarkan letak pemutusan ikatan peptida, protease dibedakan menjadi endopeptidase dan eksopeptidase. Endopeptidase adalah jenis protease yang memutuskan ikatan peptida yang berada di dalam rantai protein sehingga dihasilkan peptida dan polipeptida, sedangkan eksopeptidase adalah jenis protease yang menguraikan protein ujung rantai sehingga dihasilkan suatu asam amino dan sisa peptida. Hidrolisat protein ikan juga memiliki aktivitas antioksidan yang bermanfaat untuk mencegah ketengikan pada makanan. Hidrolisat protein ikan wader dengan variasi jenis dan konsentrasi enzim terbukti cukup efektif memiliki aktivitas antioksidan.

Penelitian ini menggunakan ikan wader dengan sembilan perbandingan konsentrasi enzim calotropin dan papain. Konsentrasi yang digunakan 90C:10P, 80C:20P, 70C:30P, 60C:40P, 50C:50P, 40C:60P, 30C:70P, 20C:80P, dan 10C:90P. Sampel hidrolisat protein ikan wader dibuat dengan cara menghancurkan 50 gram daging ikan wader dengan penambahan aquadest 2:1. Proses hidrolisis suspensi ikan wader dilakukan pada suhu 55°C dengan penambahan kombinasi konsentrasi enzim biduri dan papain. Hasil hidrolisis kemudian disaring dan dikeringkan menggunakan *freezedryer*. Analisis yang dilakukan pada hidrolisat protein ikan

wader adalah aktivitas enzim biduri dan papain, kadar protein terlarut, aktivitas antioksidan metode DPPH, dan daya reduksi metode *reducing power*/

Hasil penelitian menunjukkan bahwa enzim papain memiliki aktivitas 5,73 kali lebih tinggi dibandingkan enzim biduri. Hasil uji aktivitas antioksidan dan nilai *reducing power* tertinggi dimiliki oleh sampel 40B:60P yaitu hidrolisat protein ikan wader dengan proporsi 40% enzim biduri dan 60% enzim papain sebesar 36,41% dan nilai *reducing power* sebesar 0,570. Sementara itu, hasil uji kelarutan protein nilai tertinggi pada sampel 10B:90P pada proporsi 10% enzim biduri dan 90% enzim papain sebesar 18,62%, sedangkan hasil uji daya ikat air paling tinggi terdapat pada sampel 70C:30P sebesar 99,77% karena memiliki kemampuan mengikat air paling tinggi.

SUMMARY

Antioxidant Activity of Protein Enzymatic Hydrolysis Derived from Wader Fish (*Rasbora jacobsoni*) by Combining Calotropin dan Papain Enzymes; Kinanti Cahyaningati, 151710101070; 2019; 44 pages; Department of Agricultural Product Technology, Faculty of Agricultural Technology, University of Jember.

Wader is classified as one of freshwater fishes which is abundant and cheap yet does not meet the optimal utilization. The process of turning wader into fish protein hydrolyzate is one of the ways to increase the commercial values of wader. Fish protein hydrolyzate is produced from a breaking down process of fish protein into modest peptides and amino acids through the process of hydrolysis of enzyme. An enzymatic hydrolysis can be done by using protease enzymes such as calotropin and papain enzymes. Based on the location of the dissolution of the peptide bonds, protease is distinguished into endopeptidase and eksopeptidase enzymes. Endopeptidase enzyme is a type of protease that breaks the peptide bonds which are in the protein chain, so it can produce peptides and polypeptides. Meanwhile, eksopeptidase is a type of protease that breaks down the chain-end proteins, so that it will produce an amino acid and the rest of the peptides. The hydrolyzate fish protein also has the antioxidant activity that is useful to prevent rancid odors in food. The protein hydrolyzates of wader with varying types and concentrations of enzymes are proven to be quite effective in having the antioxidant activities.

This research uses wader in nine comparisons of calotropin and papain enzymes concentrations as the object of this research. The concentrations used are 90C:10P, 80C:20P, 70C:30P, 60C:40P, 50C:50P, 40C:60P, 30C:70P, 20C:80P, dan 10C:90P. The protein hydrolyzate samples of wader are made by destroying 50 grams of its meat with the addition of aquadest in 2:1. The hydrolysis process of the wader suspension is carried out at 55°C by adding a combination of the enzyme concentrations of calotropin and papain. The hydrolysis results are then filtered and dried by using freeze dryer. The analysis which is done to the wader protein hydrolyzate were the activity of calotropin and papain enzymes, protein solubility, antioxidant activity of the DPPH method, and **reducing power method**

The result of this research shows us that the papain enzyme has an activity of 5.73 times higher than the calotropin enzyme. The test results of the antioxidant activity and the highest value of reducing power is possessed by the 40B:60P sample where the protein hydrolyzates of wader is in a proportion of 40% of calotropin enzymes and 60% of papain enzymes are 36.41%, while its reducing power is in 0.570. Meanwhile, the highest result of the protein solubility test is owned by the 10B:90P sample in the proportion of 10% of calotropin enzymes and 90% of papain enzymes is in 18.62%. Lastly, while the highest water binding test results were found in the 70C: 30P sample of 99.77% because it has the highest water binding ability.

PRAKATA

Alhamdulillah, segala puji dan syukur yang tak terhingga penulis ucapkan kepada Allah SWT atas segala nikmat, rahmat dan hidayah-Nya serta sholawat kepada Nabi Muhammad SAW yang selalu menjadi panutan bagi kita semua hingga akhir zaman, sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik. Skripsi ini penulis persembahkan untuk :

1. Allah SWT yang telah memberikan ridho, hidayah, kekuatan, kelancaran dan kemudahan dalam melaksanakan penelitian ini;
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 sekaligus Dosen Pembimbing Utama yang selalu membimbing dengan penuh ketulusan, kesabaran, totalitas, meluangkan waktu dan memberi motivasi serta selalu menjadi inspirasi dalam belajar;
4. Bapak Ardiyan Dwi Masahid, S.TP., M.P., selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu dan pikiran dengan penuh kesabaran, ketulusan, dan keikhlasan membimbing dalam perjalanan menyelesaikan skripsi ini;
5. Ahmad Nafi', S.TP., M.P dan Dr. Triana Lindriati, S.T., M.P, selaku tim penguji yang telah memberikan saran dan evaluasi yang membangun demi perbaikan skripsi ini;
6. Seluruh Karyawan dan Teknisi Laboratorium Rekayasa Proses Pengolahan Hasil Pertanian, Laboratorium Kimia dan Biokimia, Laboratorium Analisa Terpadu di Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember;
7. Bapak Nanang Arisona dan Ibu Mardiana Rahmawati, kedua orang tuaku tercinta yang sangat amat saya sayangi dan cintai yang selalu mendoakan, memberi semangat, motivasi, dan selalu memberi yang hal terbaik;
8. Puti Ilalang Sunyi, adikku tercinta yang sangat saya cintai yang selalu mendoakan, memberi semangat dan motivasi serta seluruh keluarga besar yang selalu mendoakan dan mengusahakan yang terbaik untukku;

9. Keluarga Bapak Arief Rijadi yang telah menjadi keluarga kedua di Jember yang selalu mendoakan, menyemangati, dan memberi motivasi selama ini.
10. Wahyu Irawan Rusdiatma yang selalu memberikan semangat, mendoakan dan memberi motivasi selama ini;
11. Rekan-rekan penelitian yang aku banggakan yaitu Yolla Leonanda Winoer, Kind Aisyah Amini, Dinda Aulia Rizky, Seno Dwi Putra dan Dzanil Januar, yang telah tulus saling membantu, menyemangati dan membuat pekerjaan di laboratorium menjadi terasa lebih ringan
12. Teman-teman terbaikku teman seperjuangan Angkatan FTP 2015, Sahabat THP-A Angkatan 2015, Sahabat seperjuangan (Yolla Leonanda Winoer, Balkish Indri Mulya C, Bella Nur F, Neza Annisa Pradilla, dan Mujiyati) yang saling memberikan motivasi untuk tetap bersemangat dalam suasana suka duka yang indah;

Jember, 25 Juli 2019

Penulis

DAFTAR ISI

| | Halaman |
|--|---------|
| HALAMAN JUDUL..... | i |
| HALAMAN PERSEMBAHAN..... | ii |
| HALAMAN MOTO | iii |
| HALAMAN PERNYATAAN..... | iv |
| HALAMAN PEMBIMBINGAN | v |
| HALAMAN PENGESAHAN | vi |
| RINGKASAN..... | vii |
| SUMMARY..... | ix |
| PRAKATA | xii |
| DAFTAR ISI | xiv |
| DAFTAR TABEL | xv |
| DAFTAR GAMBAR | xvi |
| DAFTAR LAMPIRAN | xvii |
| BAB 1. PENDAHULUAN | 1 |
| 1.1 Latar Belakang..... | 1 |
| 1.2 Rumusan Masalah..... | 2 |
| 1.3 Tujuan | 2 |
| 1.4 Manfaat | 3 |
| BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA | 4 |
| 2.1 Karakteristik Ikan Wader..... | 4 |
| 2.2 Enzim Protease | 5 |
| 2.3 Enzim Biduri sebagai Eksopeptidase | 6 |
| 2.4 Enzim Papain sebagai Endopeptidase..... | 7 |
| 2.5 Hidrolisis Protein | 8 |
| 2.6 Hidrolisat Protein Ikan..... | 9 |
| 2.7 Aktivitas Antioksidan | 10 |
| BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN | 12 |
| 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian | 12 |
| 3.2 Bahan dan Alat Penelitian..... | 12 |

| | |
|---|-----------|
| 3.3 Rancangan Penelitian | 13 |
| 3.4 Pelaksanaan Penelitian | 13 |
| 3.4.1 Ekstraksi Enzim Calotropin dan Enzim Papain | 13 |
| 3.4.2 Pembuatan Hidrolisat Protein Ikan | 15 |
| 3.5 Parameter Pengamatan | 16 |
| 3.6 Prosedur Analisis | 17 |
| 3.6.1 Pengujian Aktivitas Enzim Calotropin dan Papain | 17 |
| 3.6.2 Uji Kadar Protein Terlarut | 17 |
| 3.6.3 Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH (2,2 <i>diphenyl-1picrylhydrazyl</i>) | 18 |
| 3.6.4 Uji Daya Reduksi Antioksidan Metode <i>Reducing Power</i> | 18 |
| 3.6.5 Uji Daya Ikat Air (<i>Water Holding Capacity</i>)..... | 19 |
| 3.7 Analisis Data | 20 |
| BAB 4. PEMBAHASAN | 21 |
| 4.1 Aktivitas Enzim Calotropin dan Papain | 21 |
| 4.2 Kadar Protein Terlarut | 22 |
| 4.3 Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH (2,2 <i>diphenyl-1</i> <i>picrylhydrazyl</i>) | 24 |
| 4.4 Daya Reduksi Antioksidan Metode <i>Reducing Power</i> | 26 |
| 4.5 Daya Ikat Air (<i>Water Holding Capacity</i>)..... | 28 |
| BAB 5. PENUTUP | 30 |
| 5.1 Kesimpulan | 30 |
| 5.2 Saran..... | 30 |
| DAFTAR PUSTAKA | 31 |
| LAMPIRAN | 37 |

DAFTAR TABEL

| | Halaman |
|--|---------|
| 2.1 Komposisi Kimia Ikan Wader dalam 100 g Daging | 5 |
| 2.2 Karakteristik Beberapa Jenis Hidolizat Protein Ikan..... | 11 |
| 3.1 Persentase Kombinasi Enzim Biduri dan Papain | 13 |



DAFTAR GAMBAR

| | Halaman |
|---|---------|
| 2.1 Bentuk Fisik Ikan Wader..... | 5 |
| 2.2 Proses Hidrolisis Protein dengan Menggunakan Enzim | 9 |
| 2.3 Reaksi Katalis Protease dalam Menghidrolisis Ikatan Peptida Protein..... | 9 |
| 3.1 Skema Pembuatan Enzim Calotropin dan Papain | 14 |
| 3.2 Diagram Alir Pembuatan Hidrolisat Protein Ikan | 15 |
| 4.1 Nilai Unit Aktivitas Enzim Calotropin dan Papain..... | 21 |
| 4.2 Aktivitas Antioksidan DPPH Hidrolisat Protein Ikan Wader | 22 |
| 4.3 Aktivitas Antioksidan (Reducing Power) Ikan Wader..... | 24 |
| 4.4 Kelarutan Protein Pada Hidrolisat Protein Ikan Wader..... | 26 |
| 4.5 Daya Serap Air Hidrolisat Protein Ikan Wader..... | 29 |

DAFTAR LAMPIRAN

| Lampiran | Halaman |
|---|-----------|
| A. Data Hasil Analisis | 37 |
| A.1 Aktivitas Enzim Calotropin dan Enzim Papain | 37 |
| A.2 Aktivitas Antioksidan Metode DPPH (<i>2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl</i>)..... | 37 |
| A.3 Aktivitas Antioksidan Metode Reducing Power | 38 |
| A.4 Kadar Protein Terlarut | 38 |
| A.5 Daya Ikat Air | 41 |
| B. Gambar | 42 |
| B.1 Sampel Sebelum Proses Hidrolisis | 42 |
| B.2 Sampel Saat Proses Hidrolisis | 42 |
| B.3 Sampel Setelah Proses Hidrolisis | 42 |
| B.4 Proses Pengeringan Menggunakan Freeze Dryer | 43 |
| B.5 Uji Aktivitas Antioksidan Metode DPPH..... | 43 |
| B.6 Uji Daya Reduksi Antioksidan Metode Reducing Power | 43 |
| B.7 Uji Kadar Protein Terlarut | 44 |
| B.8 Daging Ayam Sebelum Pemasakan..... | 44 |
| B.9 Daging Ayam Setelah Pemasakan..... | 44 |

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan negara yang memiliki potensi kelautan dan perikanan yang sangat beragam. Ikan sebagai salah satu bahan pangan merupakan sumber protein hewani yang tinggi dan memiliki umur simpan yang relatif pendek sehingga mudah mengalami kerusakan setelah dilakukan penangkapan. Menurut Witono *et al.*, (2016) *Rasbora jacobsoni* atau yang biasa dikenal di Indonesia sebagai ikan wader adalah salah satu jenis ikan air tawar yang melimpah dan memiliki harga murah dibandingkan dengan ikan air tawar lainnya. Berdasarkan Badan Pusat Statistik Kabupaten Jember (2015) produksi ikan wader sebesar 33,30 ton pertahun. Tingginya permintaan dan minat masyarakat terhadap ikan wader, tidak sebanding dengan nilai ekonominya yang rendah. Pengolahan ikan wader menjadi hidrolisat protein ikan merupakan salah satu cara meningkatkan nilai komersial dari wader. Menurut Zaelani (2012) kandungan protein dalam 100 gram daging ikan wader sebesar 14,8 gram sehingga berpotensi untuk diolah menjadi hidrolisat protein ikan.

Hidrolisat protein ikan merupakan produk yang dihasilkan dari penguraian protein ikan menjadi peptida sederhana dan asam amino melalui proses hidrolisis oleh enzim, asam, atau basa. Hidrolisis protein menggunakan enzim merupakan cara yang efisien karena dapat menghasilkan hidrolisat protein yang terhindar dari kerusakan asam amino tertentu yaitu triptofan dan glutamin (Kristinsson, 2007). Hidrolisis secara enzimatik dapat dilakukan dengan menggunakan jenis enzim protease seperti enzim calotropin dan enzim papain. Berdasarkan letak pemutusan ikatan peptida, protease dibedakan menjadi endopeptidase dan eksopeptidase. Enzim papain tergolong endopeptidase (Poedjiadi, 2006), sedangkan enzim calotropin tergolong eksopeptidase (Witono, 2009). Endopeptidase adalah jenis protease yang memutuskan ikatan peptida yang berada di dalam rantai protein sehingga dihasilkan peptida dan polipeptida, sedangkan eksopeptidase adalah jenis protease yang menguraikan protein ujung rantai sehingga dihasilkan suatu asam amino dan sisa peptida (Rao *et al.*, 1998).

Hidrolisat protein ikan (HPI) terbukti memiliki efek hipokolesterolemik (Wergendahl *et al.*, 2004), antioksidan (Je *et al.*, 2008) dan anti inflamasi (Marchbank *et al.*, 2009). Hidrolisat protein ikan juga memiliki aktivitas antioksidan yang bermanfaat untuk mencegah ketengikan pada makanan (Venugopal, 2006). Aktivitas antioksidan sangat erat kaitannya dengan ikatan peptida yang terdapat pada protein serta asam amino yang terkandung di dalamnya. Berdasarkan penelitian Wahyuningtyas (2018), aktivitas antioksidan hidrolisat protein ikan wader memiliki % penghambatan sebesar 38,30% dengan penambahan 3% enzim calotropin sehingga memiliki sifat antioksidatif yang bermanfaat bagi manusia. Untuk mengetahui peran enzim calotropin dan enzim papain dalam menghidrolisis protein ikan wader sehingga diperoleh aktivitas antioksidan hidrolisat protein ikan yang tinggi, maka perlu dilakukan penelitian terhadap perbedaan kombinasi konsentrasi enzim calotropin dan enzim papain. Selain itu, beberapa parameter seperti kadar protein terlarut yang dapat mendukung adanya kemampuan fungsional dalam hidrolisat protein ikan wader.

1.2 Rumusan Masalah

Hidrolisat protein ikan wader memiliki potensi besar dalam pengembangannya sebagai sumber senyawa antioksidan alami dan memiliki sifat fungsional yang bermanfaat bagi manusia. Pembuatan hidrolisat protein ikan wader menggunakan enzim calotropin telah dilakukan dan menunjukkan aktivitas terbaiknya pada konsentrasi yang berbeda. Namun, penggunaan kombinasi enzim calotropin dan enzim papain dalam pembuatan hidrolisat protein ikan wader yang berpotensi sebagai antioksidan belum pernah dilakukan. Sehingga perlu dilakukan penelitian mengenai hidrolisis protein ikan wader menggunakan kombinasi enzim calotropin dan papain, serta bagaimana aktivitas antioksidan dan sifat fungsional dari hidrolisat protein ikan wader yang dihasilkan dari proses hidrolisis tersebut.

1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah :

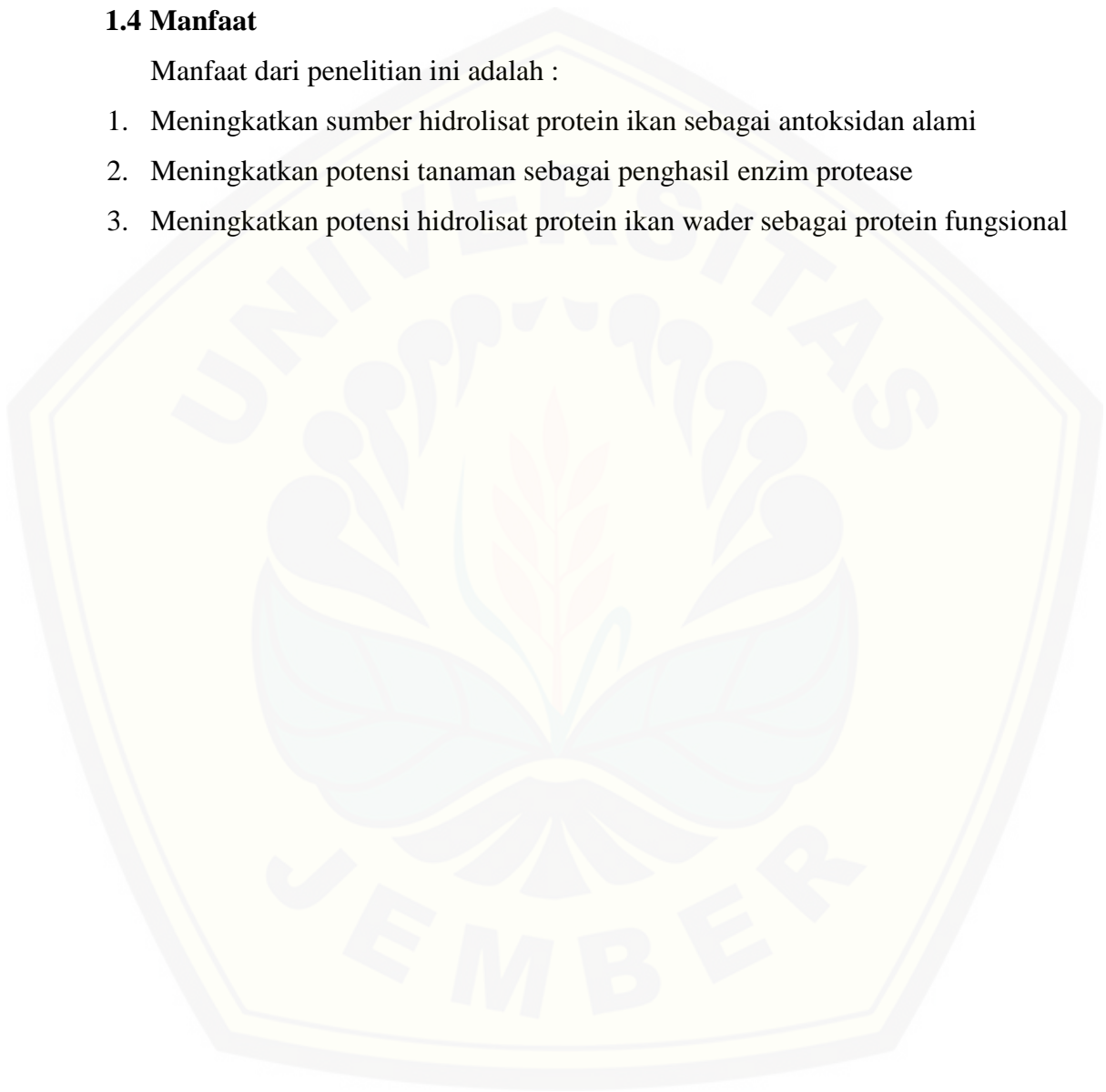
1. Mengetahui aktivitas enzim calotropin dan papain

2. Mengetahui aktivitas antioksidan hidrolisat protein ikan wader dengan variasi jenis dan konsentrasi enzim
3. Mengetahui potensi hidrolisat protein ikan wader sebagai protein fungsional

1.4 Manfaat

Manfaat dari penelitian ini adalah :

1. Meningkatkan sumber hidrolisat protein ikan sebagai antioksidan alami
2. Meningkatkan potensi tanaman sebagai penghasil enzim protease
3. Meningkatkan potensi hidrolisat protein ikan wader sebagai protein fungsional



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Karakteristik Ikan Wader

Ikan wader (*Rasbora jacobsoni*) merupakan ikan yang memiliki ukuran kecil yang hidup dipermukaan air yang tenang. Penyebaran ikan wader di Indonesia sangat luas, antara lain Sumatra, Jawa, Kalimantan, Bali, Nusa Tenggara, dan Sulawesi (Budiharjo, 2002). Ikan Wader memiliki tekstur daging yang lembut dan rasa yang gurih. Duri di dalam tubuhnya juga tidak terlalu besar. Ikan Wader memiliki panjang maksimal 17 cm dengan berat berkisar antara 3,6–13,6 g (Sulistiyarto, 2012). Ikan wader memiliki warna tubuh coklat kekuningan, berwarna agak gelap dibagian 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 Budiharjo (2002), ikan wader merupakan kelompok yang terdiri adat beberapa jenis ikan, bahkan dapat berasal dari genus yang berbeda antara lain dari genus *Rasbora* dan *Puntius*. Setiap jenis memiliki sifat yang berbeda, baik ukuran tubuh, kecepatan pertumbuhan dan rasa dagingnya. Ikan Wader disebut juga sebagai wader pari, lunjar andong (Jawa), cecereh, ikan cere (Betawi), paray (Sunda), pantao, seluang (Sumatera dan Kalimantan). Sebaran ikan wader ini sangat luas, antara lain Sumatra, Jawa, Kalimantan, Bali, Nusa Tenggara dan Sulawesi.

Klasifikasi ikan wader (*Rasbora jacobsoni*) menurut Budiharjo (2002) adalah :

| | |
|------------|----------------------------|
| Kingdom | : Animalia |
| Phylum | : Chordata |
| Sub Philum | : Vertebrata |
| Class | : Pisces |
| Sub Class | : Teleostei |
| Ordo | : Cypriniformes |
| Familia | : Cyprinidae |
| Genus | : <i>Rasbora</i> |
| Species | : <i>Rasbora jacobsoni</i> |

Adapun bentuk fisiologis ikan wader dapat dilihat pada Gambar 2.1



Gambar 2.1 Bentuk Fisik Ikan Wader (*Rasbora jacobsoni*)

Ikan wader memiliki kadar protein yang cukup tinggi. Menurut Akbariwati (2015), fillet ikan wader memiliki kadar protein sebesar 12,56%. Tingginya kandungan protein dalam daging ikan wader dapat dimanfaatkan sebagai hidrolisat protein ikan. Kandungan nilai gizi ikan wader dalam 100 gram daging, dapat dilihat pada Tabel 2.1

Tabel 2.1 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)

2.2 Enzim Protease

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

Enzim sebagai protein akan mengalami denaturasi jika suhunya dinaikkan. Akibatnya daya kerja enzim menurun. Pada suhu 45°C efek predominanya masih memperlihatkan kenaikan aktivitas sebagaimana dugaan dalam teori kinetik. Tetapi

lebih dari 45°C menyebabkan denaturasi ternal lebih menonjol dan menjelang suhu 55°C fungsi katalitik enzim menjadi punah (Gaman dan Sherrington, 1994). Hal ini juga terjadi karena semakin tinggi suhu semakin naik pula laju reaksi kimia baik yang dikatalisis maupun tidak. Karena itu pada suhu 40°C, larutan tidak ada gumpalan, begitu juga pada suhu ruang, sedangkan pada suhu 100°C masih ada gumpalan-gumpalan yang menunjukkan kalau enzim rusak. Pada suhu ruang, enzim masih dapat bekerja dengan baik walaupun tidak optimum (Gaman dan Sherrington, 1994).

Salah satu enzim yang mempunyai peran penting dalam kehidupan adalah protease, yaitu enzim proteolitik yang bekerja memecah protein menjadi asam amino. Proteolitik termasuk kelas utama enzim hidrolase, yaitu dalam mekanisme kerjanya melibatkan air (Damodaran, 1996). Menurut Wirahadikusumah (1989), terdapat dua macam peptidase, yaitu endopeptidase dan eksopeptidase. Endopeptidase adalah enzim yang mengkatalisis pemecahan ikatan peptide pada bagian dalam rantai polipeptida. Eksopeptidase merupakan enzim yang mengkatalisis ikatan peptide pada ujung rantai polipeptida sehingga dihasilkan ikatan peptide dan asam amino. Enzim dapat diproduksi oleh mikroba atau bahan lainnya, misalnya bahan hewani atau nabati (Winarno, 1995). Enzim protease yang dihasilkan dari tanaman antara lain enzim papain dan kimopapain dari getah tanaman pepaya, enzim fisin dari getah tanaman Ficus, enzim bromelin yang diisolasi dari batang atau sari buah nanas (Winarno, 1995).

2.3 Enzim Calotropin sebagai Eksopeptidase

Tanaman biduri merupakan salah satu tanaman yang dapat menghasilkan enzim protease. Biduri (*Calotropis gigantea*) merupakan tanaman bergetah, dari seluruh bagian tanaman ini akan mengalir getah pada tempat yang dilukai atau dipotong. Getahnya berwarna putih, kental dan agak lengket. Tanaman biduri sampai saat ini belum banyak dimanfaatkan, bahkan tanaman ini sering dianggap gulma (Stenis, 1992). Saputri (2007) menyatakan bahwa enzim protease dari getah biduri merupakan golongan eksopeptidase dan golongan sulfhidril. Eksopeptidase merupakan golongan enzim yang memecah protein dari luar. Sedangkan enzim

protease sulfhidril artinya mempunyai residu sulfhidril pada lokasi aktif. Enzim ini dihambat oleh senyawa oksidator, alkilator, dan logam berat.

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

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

2.4 Enzim Papain sebagai Endopeptidase

Papain adalah enzim yang dihasilkan dari getah tanaman pepaya dan buah pepaya muda. Batang, daun, dan buah pepaya muda mengandung getah berwarna putih. Getah ini mengandung suatu enzim pemecah protein atau enzim proteolitik yang disebut papain. Getah pepaya mengandung 10% papain, 45% kimopapain dan 20% lisozim (Winarno, 1993). Enzim papain termasuk enzim protease, mampu menghidrolisis ikatan peptida pada asam amino lisin dan leusin. Suhu optimum papain berkisar antara 50°C - 65°C, dan pH optimum 5-7 (Kusumadjaja., *et al* 2005). Papain memiliki daya proteolitik yang sangat aktif pada suasana reduktif, karena adanya bahan-bahan pereduksi seperti HCN, dan H₂S. Menurut Poedjadi (2006), papain tergolong ke dalam endopeptidase. Endopeptidase adalah jenis protease yang memutus ikatan peptida tidak pada ujung rantai polipeptida melainkan pada bagian dalam sehingga akan dihasilkan sejumlah peptida dan polipeptida (Rao *et al.* 1998). Endopeptidase memotong bagian dalam protein. Pemotongan ini biasanya tidak dipengaruhi oleh gugus yang terletak di ujung molekul.

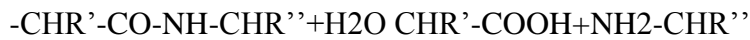
Aktivitas optimum enzim papain adalah pada suhu 60°C dan pH 7. Aktivitas papain dapat ditingkatkan dengan penambahan ion Zn^{2+} , Ion Ca^{2+} , ion Mg^{2+} , dan Cu^{2+} , sedangkan EDTA menurunkan aktivitas papain. Aktivitas papain relatif stabil pada pelarut metanol, aseton dan toluena. Papain banyak diaplikasikan pada proses pembuatan hidrolisat protein ikan (Aristotelis *et al.* 2011), kecap (Simanjorang *et al.* 2012) dan pengempukan daging (Sunarlim dan Usmiati, 2009). Hasil penelitian Witono *et al.* (2014b), pada pembuatan hidrolisat protein ikan bibisan (*Apogon albimaculosus*) menjelaskan bahwa kombinasi enzim biduri (bersifat eksopeptidase) dengan enzim papain (bersifat endopeptidase) menghasilkan rendemen dan produk Maillard yang tinggi serta tingkat ketengikan yang rendah. Peningkatan proporsi enzim papain dalam kombinasi enzim menyebabkan jumlah produk Maillard semakin tinggi. Hal tersebut mengindikasikan bahwa terdapat hubungan yang sinergis antara enzim biduri dengan papain.

2.5 Hidrolisis Protein

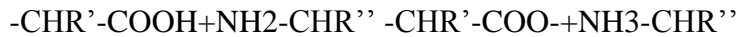
Hidrolisis protein adalah proses pecahnya atau terputusnya ikatan peptida dari protein menjadi molekul yang lebih sederhana. Hidrolisis ikatan peptida akan menyebabkan beberapa perubahan pada protein, yaitu meningkatkan kelarutan karena bertambahnya kandungan NH_3^+ dan COO^- serta berkurangnya berat molekul protein atau polipeptida dan juga rusaknya globular protein. Ketika protein terhidrolisis terjadi perubahan flavor yang disebabkan oleh pembentukan peptida-peptida rantai pendek dan asam-asam amino serta lepasnya komponen-komponen flavor non protein dari bahan baku (Winarno, 2002)

Produksi hidrolisat protein ikan dapat dilakukan secara kimiawi dan enzimatis. Hidrolisis secara enzimatis lebih menguntungkan. Hal ini dikarenakan lebih efisien dan murah, aman, tidak kehilangan asam amino esensial, serta terhindar dari perubahan atau kerusakan produk yang bersifat non-hidrolitik (Jonson dan Peterson, 1974). Prinsip dasar proses hidrolisis dapat dilihat pada Gambar 2.2.

1. Enzim membuka ikatan peptida:

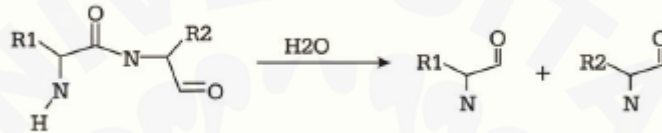


2. Proton mengalami pertukaran



Gambar 2.2 Proses hidrolisis protein dengan menggunakan enzim (Sumber: Peterson, 1981)

Secara mekanisme, enzim protease biduri memecah polipeptida protein menjadi peptida-peptida dan asam amino sederhana yang mudah larut. Pemecahan ikatan peptida selama proses hidrolisis berlangsung dapat dilihat pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3 Reaksi Katalis Protease dalam Menghidrolisis Ikatan Peptida Protein (Sumber: Witono, 2013)

Menurut Laroque et al. (2008) menyatakan bahwa proses dan hasil hidrolisis sangat dipengaruhi oleh karakteristik substrat yang dihidrolisis, enzim yang digunakan, dan kondisi selama proses yang meliputi suhu, pH, dan konsentrasi enzim yang digunakan. Disamping itu, enzim memiliki kondisi optimal dalam proses hidrolisis yang ditandai dengan meningkatnya kecepatan hidrolisis. Apabila enzim telah mengalami fase hidrolisis dengan kecepatan yang tinggi diawal, laju hidrolisis akan cenderung menurun memasuki fase diam (stasioner). Sehingga pada kondisi tersebut, peningkatan konsentrasi enzim tidak menghasilkan tingkat hidrolisis yang lebih tinggi karena ikatan peptida yang tersedia untuk dipecah terbatas (Salwanee et al., 2013).

2.6 Hidrolisat Protein Ikan

Hidrolisat protein ikan adalah protein ikan yang telah terurai menjadi asam amino karena adanya proses hidrolisis oleh asam, basa ataupun enzim. Kelebihan dari hidrolisat protein ikan adalah memiliki sifat fungsional yang lebih baik daripada tepung ikan karena kelarutannya yang sangat tinggi dan kelarutan ini tidak banyak

berubah meskipun mendapat perlakuan suhu tinggi, misalnya pada proses sterilisasi mampu bertahan dalam bentuk cair. Hidrolisat protein ikan dihasilkan dari penguraian protein ikan menjadi peptida sederhana dan asam amino melalui proses hidrolisis baik oleh enzim, asam maupun basa. Reaksi hidrolisis terhadap protein ikan dengan menggunakan enzim proteolitik pada kondisi suhu, pH dan waktu hidrolisis yang terkontrol dapat menghasilkan produk akhir berupa hidrolisat protein ikan yang berkualitas (Kristinsson 2007).

Menurut Muljanah (1991), hidrolisat protein dapat berbentuk cair, pasta, atau bubuk yang bersifat higroskopis. Hidrolisat protein ikan memiliki peran penting dalam memperbaiki sifat fungsional dan kualitas bahan pangan. Hidrolisat protein ikan memiliki kandungan protein tinggi, asam amino lengkap, daya cerna protein yang tinggi dan sifat fungsional penting dalam pengolahan pangan, seperti flavour enhancer, kelarutan tinggi dalam air, serta pembentuk tekstur (Hall dan Ahmad, 1992). Pengolahan ikan menjadi hidrolisat protein bertujuan untuk mengatasi kerusakan ikan dan mendapatkan bahan pangan yang lebih mudah dicerna oleh tubuh karena proteinnya telah terurai menjadi asam amino dan peptida yang lebih sederhana. Hidrolisat protein ikan merupakan protein ikan yang telah terurai menjadi turunan-turunan protein karena adanya proses hidrolisis baik secara kimiawi maupun enzimatis (Haslina *et al.*, 2006).

2.7 Aktivitas Antioksidan

Antioksidan adalah suatu senyawa atau komponen kimia yang dalam kadar atau jumlah tertentu mampu menghambat atau memperlambat kerusakan akibat proses oksidasi. Antioksidan dan antibakteri sangat berguna bagi bidang kesehatan dan pangan. Antioksidan sering digunakan dalam bentuk suplemen untuk membantu meningkatkan kesehatan tubuh dan mengurangi risiko terjadinya penyakit akibat radikal bebas misalnya kanker, diabetes, penuaan dini, dan jantung koroner. Antioksidan dan antibakteri juga digunakan sebagai pengawet untuk mencegah terjadinya oksidasi lemak serta membantu menghambat pertumbuhan bakteri penyebab kebusukan pada makanan (Najafian dan Babji 2011; Intarasirisawat *et al.* 2014). Hidrolisat protein yang memiliki aktivitas antioksidan

juga bisa dijadikan sebagai alternatif pengganti antioksidan sintetik misalnya butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluena (BHT) dan propyl gallate (PG) yang diketahui mampu menginduksi kerusakan DNA serta menimbulkan toksik (Luo et al. 2012).

Beberapa penelitian pada hidrolisat protein ikan menunjukkan adanya kemampuan sebagai antioksidan alami. Samaranayaka dan Li-Chan (2011) menyatakan bahwa potensi sumber antioksidan alami dari hidrolisat protein ikan ditunjukkan oleh kemampuannya dalam memerangkap radikal bebas (free radical scavenging), donor proton, dan pengikat ion logam. Kemampuan hidrolisat protein sebagai antioksidan alami dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya adalah karakteristik hidrolisat protein yang meliputi kadar protein dan derajat hidrolisis. Karakteristik beberapa jenis hidrolisat protein ikan dapat dilihat pada Tabel 2.2.

Tabel 2.2 Karakteristik beberapa jenis hidrolisat protein ikan

| Karakteristik Hidrolisat Protein | Jenis Ikan | | |
|--|-----------------|-------------|------------------------|
| | Tuna Sirip Biru | Lemuru | small spotted catshark |
| Kadar protein (%) | 62,5 – 67,8 | 60,7 – 66,4 | 87,0 – 89,5 |
| Derajat hidrolisis (%) | 19,7 – 21,0 | 13,2 – 14,9 | 17,3 – 19,2 |
| Penghambatan DPPH (mg/ml) | 1,47 – 1,63 | 0,91 – 1,75 | 3,82 – 4,45 |
| Aktifitas pengkelatan Fe ²⁺ (mg/ml) | 0,42 – 0,49 | 0,32 | 0,32 – 0,51 |

Sumber : Garcia-Moreno *et al.* (2014)

Selain kadar protein, derajat hidrolisis juga memiliki pengaruh yang berbeda pada aktivitas penghambatan radikal bebas DPPH tergantung pada bahan baku dan perlakuan enzimatis yang diberikan. Selaras dengan hal tersebut You *et al.* (2009) juga menyatakan bahwa perbedaan derajat hidrolisis dan jenis protease yang digunakan dapat menghasilkan panjang rantai dan gugus terminal peptida yang berbeda pula. Hal tersebut juga memiliki pengaruh pada aktivitas antioksidan hidrolisat protein ikan. Selain itu, ukuran peptida utamanya dibawah 1000 Da juga berkontribusi pada aktivitas antioksidan hidrolisat protein ikan (Garcia-Moreno *et al.*, 2014). Ukuran peptida yang lebih kecil dan sederhana dimungkinkan dapat meningkatkan ikatan antara peptida-peptida bebas (Rooma *et al.*, 2012)

BAB 3 METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia dan Biokimia Hasil Pertanian, Laboratorium Analisa Terpadu, Laboratorium Rekayasa Proses Pengolahan Hasil Pertanian Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember, dan Laboratorium Biologi Fakultas Farmasi Universitas Jember pada bulan Maret 2019 sampai Juli 2019.

3.2 Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1 Bahan Penelitian

Jenis ikan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ikan wader (*Rasbora jacobsoni*) yang diperoleh dari Pasar Tanjung, Jember. Bahan baku lainnya adalah enzim papain hasil ekstraksi dari getah tanaman pepaya yang diperoleh di Kecamatan Sumpalsari, Jember dan enzim calotropin hasil ekstraksi dari getah tanaman biduri yang diperoleh di pesisir Pantai Puger, Jember

Penelitian ini menggunakan berbagai macam bahan kimia, yaitu aquades, DPPH 0,1 mM, HCl, asam askorbat, TCA (asam trikloroasetat) 10%, BHT (*Butylated Hydroxytoluene*), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, kasein, Na_2CO_3 , *follin ciocalteau*, tirosin, etanol p.a, potasium ferricyanide [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$] 1%, FeCl_3 0,1%, BSA (Bovine Serum Albumin), NaOH 0,1 N, CuSO_4 1%, Sodium Pottasium Tartrat

3.2.2 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi *food processor*, pisau *stainless steel*, neraca analitik Ohaus, pH meter (Jen Way tipe 3320), *freeze drying*, pipet mikro, *eppendorf*, *yellow tip*, *blue tip*, spatula besi, spatula kaca, botol semprot, *magnetic stirrer*, pi-pump, spektrofotometer Shimadzu dan kuvetnya, sentrifuge dan tabungnya (Yenaco model YC-1180), vortex (Thermolyne type 16700), lemari pendingin, waterbath (GFL 1083) dan peralatan gelas kaca (Pyrex dan Duran)

3.3 Rancangan Penelitian

Rancangan yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan satu jenis perlakuan yaitu perbedaan konsentrasi kombinasi enzim calotropin dan papain. Jenis ikan yang digunakan adalah ikan wader (*Rasbora jacobsoni*) sebagai penghasil hidrolisat protein berdasarkan penelitian Wahyuningtyas (2018), sedangkan jenis dan konsentrasi enzim papain dan enzim calotropin yang digunakan berdasarkan hasil penelitian Diamonda (2018) yang telah dimodifikasi. Pengujian dilakukan menggunakan sembilan perbandingan konsentrasi enzim calotropin dan papain dengan tiga kali pengulangan dan dua kali pengamatan (*duplo*). Perbandingan konsentrasi kombinasi dapat dilihat pada Tabel 3.1

Tabel 3.1 Persentase Kombinasi Enzim Calotropin dan Papain

| Jenis Ikan | Konsentrasi Enzim (Calotropin : Papain) |
|------------|---|
| Ikan Wader | 90% C : 10% P |
| | 80% C : 20% P |
| | 70% C : 30% P |
| | 60% C : 40% P |
| | 50% C : 50% P |
| | 40% C : 60% P |
| | 30% C : 70% P |
| | 20% C : 80% P |
| | 10% C : 90% P |

Keterangan : % (v/b) dalam total 3% dari berat daging ikan

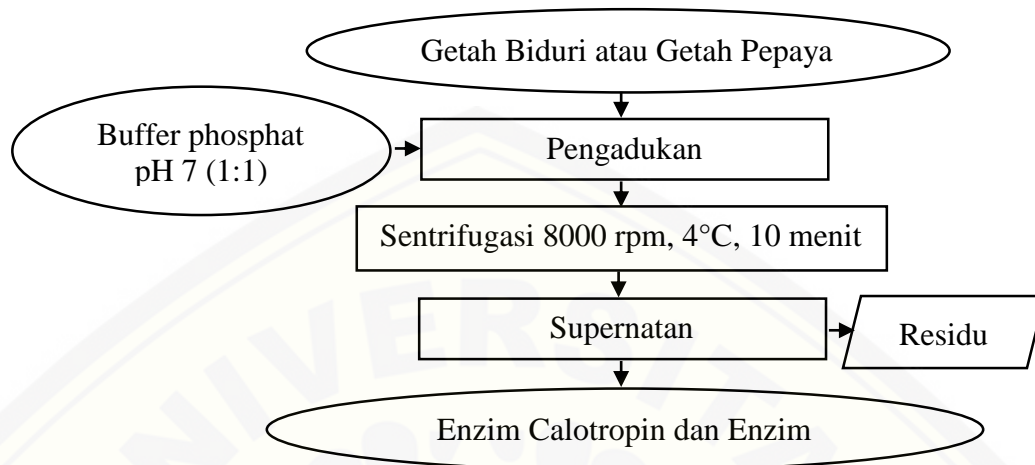
Penelitian dilakukan analisis aktivitas antioksidan dengan metode DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*), analisis daya reduksi antioksidan metode *reducing power*, analisis kadar protein terlarut dan analisis daya ikat air.

3.4 Pelaksanaan Penelitian

3.4.1 Ekstraksi Enzim Calotropin dan Enzim Papain

Penelitian pendahuluan yang dilakukan dalam tahapan ini yaitu proses pembuatan enzim calotropin dan papain yang mengacu pada penelitian Witono *et al.*, (2006). Ekstraksi ini dilakukan dengan cara mengambil getah yang terdapat dalam tanaman biduri dan pohon pepaya. Pada tanaman biduri, getah yang diambil terdapat pada bagian batang tanaman yang masih muda. Waktu yang tepat untuk pemanenan getah biduri pada pagi atau sore hari. Pada pohon pepaya, getah yang

diambil berasal dari buah pepaya yang masih muda atau berwarna hijau. Diagram alir pembuatan enzim calotropin dan papain dapat dilihat pada Gambar 3.1



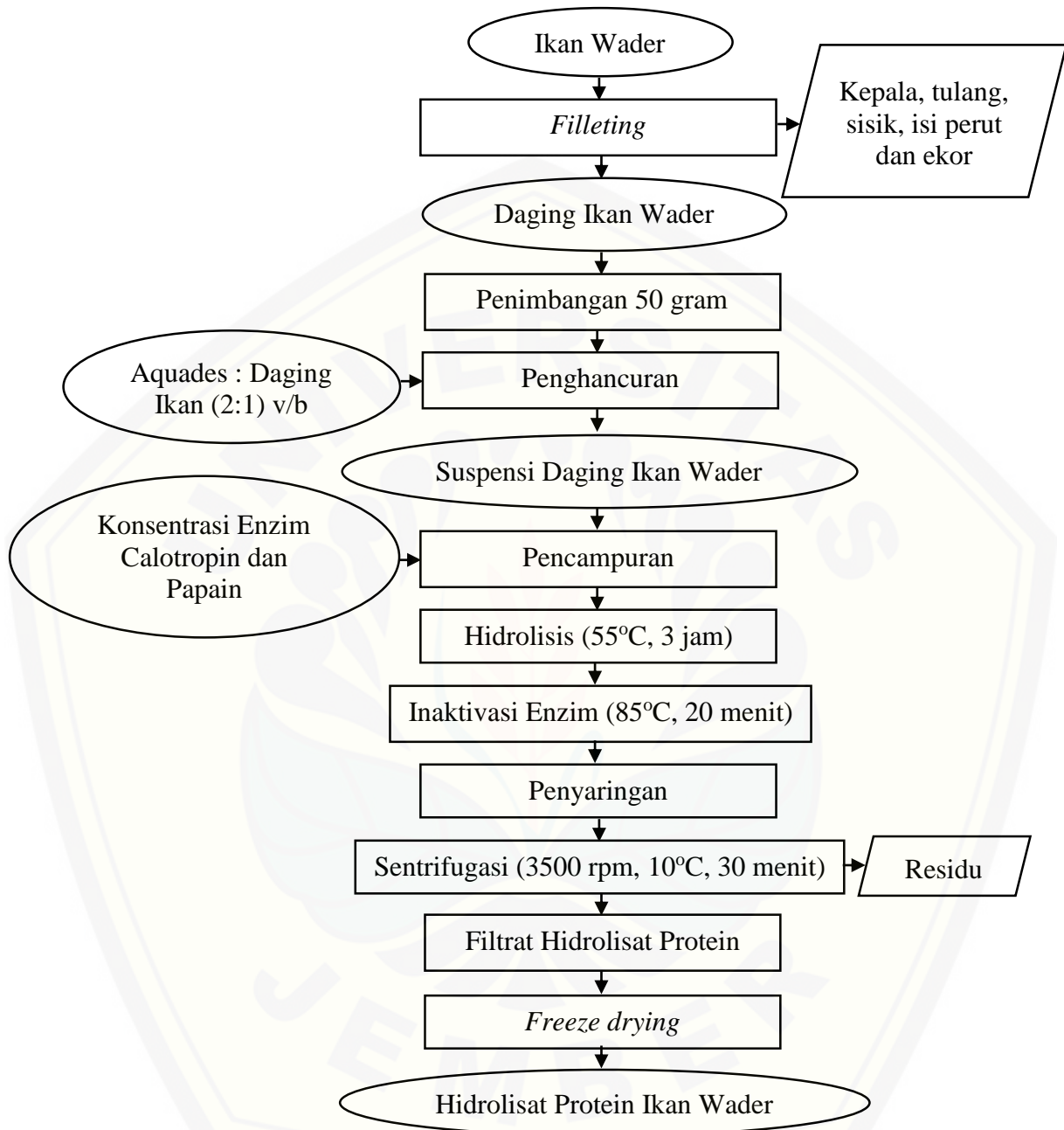
Gambar 3.1 Skema Pembuatan Enzim Calotropin dan Papain

Getah dari batang tanaman biduri dan buah pepaya yang telah diambil, ditambahkan buffer fosfat pH 7 menggunakan perbandingan 1:1 (getah biduri : buffer fosfat). Fungsi penambahan larutan buffer adalah untuk membantu mempertahankan pH dan kondisi optimum pada getah tanaman biduri. Kemudian dilakukan proses pencampuran agar kedua bahan menyatu. Selanjutnya dilakukan proses sentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C yang bertujuan untuk memisahkan supernatan dan residu. Supernatan cair yang diperoleh merupakan ekstrak kasar dari enzim protease yang digunakan untuk menghidrolisis protein ikan wader. Selanjutnya dilakukan analisis aktivitas antioksidan untuk mendapatkan sampel dengan aktivitas antioksidan tertinggi.

3.4.2 Pembuatan Hidrolisat Protein Ikan

Penelitian tahap kedua adalah proses pembuatan hidrolisat protein ikan wader yang mengacu pada penelitian Witono *et al.*, (2014b) dengan modifikasi penelitian sebelumnya (Diamonda, 2018).

Proses optimasi hidrolisat ikan wader dapat dilihat pada Gambar 3.2 berikut:



Gambar 3.2 Diagram Alir Pembuatan Hidrolisat Protein Ikan

Ikan wader yang masih dalam keadaan segar dilakukan *filleting* untuk memisahkan kepala, tulang, sisik, isi perut dan ekor sehingga diperoleh daging ikan wader. Daging ikan wader ditimbang sebanyak 50 gram lalu dihancurkan dan dihomogenisasi menggunakan *food processor* dengan perbandingan aquades dan

daging ikan adalah 2 : 1 dari berat ikan sehingga dihasilkan suspensi daging ikan. Selanjutnya suspensi ditambahkan enzim calotropin dan enzim papain sesuai perbandingan konsentrasi kemudian diletakkan dalam *waterbath* untuk dilakukan proses hidrolisis.

Hidrolisis dilakukan pada suhu 55°C selama 3 jam yang diletakkan di dalam *waterbath*. Proses hidrolisis dilakukan pada suhu 55°C selama 3 jam karena suhu dan waktu tersebut optimum untuk menghidrolisis protein dengan enzim calotropin. Jika suhu hidrolisis yang digunakan lebih dari 55°C, stabilitas molekul enzim tidak dapat dipertahankan dan pudar sehingga aktivitas proteolitiknya hilang. Jika waktu hidrolisis dibawah 3 jam maka proses hidrolisis tidak akan berjalan maksimal, sedangkan jika diatas 3 jam kerja enzim akan beada pada tahap stasioner. (Wahyuningtyas, 2018). Setelah proses hidrolisis, dilakukan pemanasan yang bertujuan untuk menginaktivasi enzim dan menghentikan proses hidrolisis pada suhu 85°C selama 20 menit. Lalu dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring dan disentrifugasi selama 30 menit dengan kecepatan 3500 rpm dengan suhu 10°C yang bertujuan untuk memisahkan supernatan dan filtrat. Supernatan yang diperoleh merupakan hidrolisat protein ikan basah.

Hidrolisat protein ikan basah yang diperoleh, selanjutnya dilakukan pengeringan dengan menggunakan *freeze drying*. Suhu yang digunakan dalam *freeze drying* sebesar -50°C selama 21 jam, jika setelah 21 jam sampel masih belum kering sempurna maka waktu akan ditambah hingga seluruhnya menjadi serbuk. Tujuan dari penggunaan *freeze drying* adalah pengeringan bahan dengan meminimalisir kandungan protein pada bahan yang mudah terdenaturasi karena panas. Serbuk hidrolisat yang didapatkan akan disimpan dalam freezer agar tetap awet dan selanjutnya akan dilakukan analisis.

3.5 Parameter Pengamatan

Parameter yang diamati dalam penelitian ini meliputi :

1. Uji Aktivitas Enzim Calotropin dan Papain (Walter, 1984)
2. Uji Kadar Protein Terlarut (*Metode Lowry*; Purwanto, 2004)

3. Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH (2,2 *diphenyl-1-picrylhydrazyl*) (Shimada *et al.*, 1992)
4. Uji Daya Reduksi Antioksidan Metode *Reducing Power* (Oyaizu, 1986)
5. Uji Daya Ikat Air (*Water Holding Capacity/WHC*) (Nichole Cumby *et al.*, 2008)

3.6 Prosedur Analisis

3.6.1 Pengujian Aktivitas Enzim Calotropin dan Papain

Metode Walter (1984) digunakan dalam pengujian aktivitas enzim calotropin dan papain. Terdapat tiga perlakuan, yaitu blanko, standar tirosin, dan sampel. Perlakuan pada blanko dan standar, enzim diganti dengan aquades dan tirosin 0,1 mM. Larutan tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit. Resi hidrolisis dihentikan dengan cara penambahan 1 ml TCA (asam trikloroasetat) 0,1 M. Larutan enzim sebanyak 0,1 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 0,5 ml kasein 1% b/v dan 0,5 ml buffer fosfat pH 7. Pada blanko dan standar ditambahkan 0,1 mL akuades lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit. Supernatan yang dihasilkan kemudian diambil sebanyak 0,75 ml dan ditambahkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 2,5 ml Na₂CO₃ 0,4 M, ditambahkan 0,5 mL pereaksi follin ciocalteau (1:2) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit. Hasil inkubasi diukur dengan spektrometer pada $\lambda = 670$ nm

Rumus pengukur aktivitas enzim protease sebagai berikut :

$$UA = \frac{Asp - Abl}{Ast - Abl} \times P \times 1/T$$

Keterangan :

- UA = Unit aktivitas enzim (dinyatakan dalam Unit/ml)
- Asp = Nilai absorpsi sampel
- Abl = Nilai absorpsi blanko
- Ast = Nilai absorpsi standar tirosin
- P = Faktor Pengenceran
- T = Waktu Inkubasi

3.6.2 Uji Kadar Protein Terlarut

Sampel sebanyak 0,1 gram dilarutkan dalam 10 ml aquades. Larutan di sentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 4000 rpm. Kemudian bagian supernatan dianalisis proteinnya dengan metode lowry.

Penentuan protein metode lowry dimulai dengan pengambilan sampel dari supernatan yang dihasilkan sebelumnya sebanyak 250 mikro liter dan ditambah reagen lowry sebanyak 2 ml kemudian divortex dan diamkan selama 10 menit. Setelah itu ditambahkan 250 mikro liter follin dan divortex. Selanjutnya didiamkan selama 20 menit lalu dilakukan pengukuran absorbansi dengan menggunakan spektrofometer pada panjang gelombang 550 nm.

3.6.3 Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH (*2,2 diphenyl-1 picrylhydrazyl*)

Aktivitas antioksidan dalam mereduksi radikal bebas dari hidrolisat protein ikan ditentukan oleh kemampuannya dalam mereduksi DPPH. Radikal DPPH (*1,1-difenil-2-pikrilhidrazil*) adalah suatu senyawa organik yang mengandung nitrogen tidak stabil dengan absorbansi kuat pada λ max 517 nm dan berwarna ungu gelap. Setelah bereaksi dengan senyawa antioksidan, DPPH tersebut akan tereduksi dan warnanya akan berubah menjadi kuning. Perubahan tersebut dapat diukur dengan spektrofotometer, dan diplotkan terhadap konsentrasi (Reynertson, 2007). Penentuan aktivitas antioksidan dilakukan dengan pengenceran hidrolisat kering protein ikan sebanyak 20 kali dalam pelarut etanol p.a. larutan sampel hidrolisat protein yang telah diencerkan diambil masing-masing 1,5 ml dan direaksikan dengan larutan DPPH 0,1 mM dalam tabung reaksi. Kemudian dilakukan homogenisasi menggunakan vortex selama 1 menit dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C. Pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 517 nm untuk mengetahui persen inhibisi terhadap radikal bebas berupa DPPH.

Aktivitas antioksidan DPPH dapat dihitung dengan menggunakan persamaan berikut :

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi blanko} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi blanko}} \times 100\%$$

3.6.4 Uji Daya Reduksi Antioksidan Metode *Reducing Power*

Penentuan *reducing power* pada hidrolisat kering protein ikan menggunakan metode dari Oyaizu (1986). Uji *reducing power* dilakukan untuk mengetahui kemampuan suatu bahan pangan sebagai antioksidan sekunder. Sampel hidrolisat kering protein ikan sebesar 2000 ppm diambil 1 ml kemudian ditambah 2,5 ml buffer pottasium fosfat 0,2 M (pH 6,6) dan 2,5 ml $K_3Fe(CN)_6$ 1%. Campuran larutan diinkubasi selama 20 menit pada suhu 50°C. Kemudian 2,5 ml asam trikloroasetat (TCA) 10% ditambahkan dan dilakukan homogenisasi menggunakan vortex yang bertujuan menghentikan reaksi. Hasil homogenisasi diambil 2,5 ml dan ditambahkan 2,5 ml aquades dan 0,5 ml klorat besai ($FeCl_3$) 0,1%. Campuran larutan didiamkan selama 30 menit sebelum diabsorbansi dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 700 nm untuk menyatakan *reducing powder* pada sampel hidrolisat kering proten ikan. Blanko menggunakan aquades sebagai pengganti sampel. Asam askorbat digunakan sebgai kurva standar dengan konsentrsi 2, 4, 6, 8, dan 10 ppm. Peningkatan nilai absorbansi menunjukkan terjadi penurunan daya (*reducing powder*) dari radikal bebas berupa $K_3Fe(CN)_6$ (*potassium ferrcyanide*)

3.6.5 Uji Daya Ikat Air (*Water Holding Capacity/WHC*)

Penentuan uji daya ikat air menggunakan media daging ayam untuk mengetahui seberapa besar kemampuan daging dalam mengikat air bebas. Daging ayam terlebih dahulu dilakukan penghancuran menggunakan food processor, kemudian timbang ayam sebanyak 5 gram. Setelah itu ditambahkan aquades 1,5 ml dan sampel hidrolisat protein ikan wader 0,05 gram. Lalu dilakukan pendiaman di dalam freezer selama 30 menit. Setelah 30 menit, sampel dimasukkan ke dalam waterbath pada suhu 95°C selama 10 menit. Kemudian sampel dialiri menggunakan air dingin dan ditimbang berat akhirnya.

$$\text{Air yang hilang} = \frac{\text{Berat Awal} - \text{Berat Akhir}}{\text{Berat Awal}} \times 100\%$$

WHC (%) = 100- Air yang Hilang

3.7 Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian diolah menggunakan *software Microsoft Excel* dan dianalisis menggunakan metode deskriptif untuk mendapatkan sampel dengan aktivitas antioksidan tertinggi. Data ditampilkan dalam bentuk tabel dan dibuat grafik serta histogram untuk mempermudah dalam interpretasi data.



BAB 5 PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa :

1. Aktivitas enzim calotropin dalam proses hidrolisis protein sebesar 15,04 U/ml dan enzim papain sebesar 86,32 U/ml. Enzim papain memiliki aktivitas 5,73 kali lebih tinggi dibandingkan enzim calotropin.
2. Aktivitas antioksidan hidrolisat protein ikan wader dengan metode DPPH dan *reducing power* tertinggi dimiliki oleh sampel 40B:60P yaitu hidrolisat protein ikan wader dengan proporsi 40% enzim calotropin dan 60% enzim papain dengan nilai berturut-turut yaitu 36,41% RSA dan 0,570
3. Hidrolisat protein ikan wader memiliki kemampuan daya ikat air yang tinggi karena mampu mempertahankan komponen protein di dalam daging,

5.2 Saran

Selama melaksanakan penelitian pastikan bahan kimia yang digunakan tidak rusak, jumlah dan konsentrasi bahan yang digunakan harus sesuai prosedur agar mendapatkan hasil yang akurat. Penelitian lebih lanjut terkait aktivitas antioksidan dengan metode lain seperti uji FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) untuk menguji antioksidan dalam hidrolisat protein ikan wader.

DAFTAR PUSTAKA

- Ajibola, C. F., Fashakin, J. B., Fagbemi, T. N., & Aluko, R. E. 2011. Effect of Peptide Size on Antioxidant Properties of African Yam Bean Seed (*Sphenostylis Stenocarpa*) Protein Hydrolysate Fractions. *International Journal of Molecular Sciences*. Volume 12(10): 6685–6702
- 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
- Aristotelis, T., Himonides, T., Taylor, A. K. D., dan Morris, A. J. 2011. Enzymatic Hydrolysis of Fish Frame Using Pilot Plant Scale Systems. *Food and Nutrition Science*. Vol. 2: 586-593.
- Badan Pusat Statistik Kabupaten Jember. 2013. *Produksi dan Nilai Produksi Budidaya Perikanan Air Tawar Menurut Jenis Produksi dan Jenis Perairan*. <http://jemberkab.bps.go.id/>. Diakses pada 29 Juli 2019
- Bordbar S, Ebrahimpour A, Hamid AA, Saari N. 2013. The Improvement of the Enogenous Antioxidant Property of Stone Fish (*Actinopyga lecanora*) Tissue Using Enzymatic Proteolysis. *Journal of Food Science* 9:15-18.
- Budiharjo, A. 2002. *Seleksi dan Potensi Budidaya Jenis-Jenis Ikan Wader dari Genus Rasbora*. *Biodiversitas*. 3 (2): 225-230
- Damodaran, S. 1996. *Amino Acids, Peptides and Protein*. Di dalam: Fennema OR, editor. *Food Chemistry*. Ed ke-3. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Diamonda, S.A. 2018. “Aktivitas Antioksidan Hidroisat Protein Ikan Baji-Baji (*Platycephalidae cymbacephalus*) dan Ikan Tawes (*Barbonymus gonionotus*) Dengan Variasi Jenis dan Konsentrasi Enzim”. *Skripsi*. Jember: Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember
- Ebrahinzadeh M.A., Pourmorad F., Bekhradnia A.R. 2008. Iron Chelating Activity Screening, Phenol, and Flavonoid Content of Some Medical Plants From Iran. *Afr. Journal Biotechnol*. Volume 32: 43-49.
- El Lahamy AA, Khalil KI, El Sherif SA, Abdelazim SAA, Mahmud AA. 2018. Effect of frozen storage and cooking method on amino acid composition of mullet fish (*Mugil cephalus*). *MOJ Food Processing & Technology*. 6(6): 458-463.
- Ferreira ICFR, Paula Baptista, Miguel Vilas-Boas, dan Lillian Barros. 2007. *Free-Radical Scavenging Capacity and Reducing Power of Wild Edible*

- Mushrooms from Northeast Portugal: Individual Cap and Stipe Activity.* Food Chemistry. 100: 1511-1516.
- Froese, R. And Pauly. Editors. 2010. *Rasbora lateristriata*, Yellow Rasbora. Fish Base. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org, version (05/10).
- Gaman, P.M. dan KB Sherrington. 1994. *Ilmu Pangan Pengantar Ilmu Pangan Nutrisi dan Mikrobiologi*. Yogyakarta: UGM Press.
- García-Moreno, P. J., Batista, I., Pires, C., Bandarra, N. M., Espejo-Carpio, F. J., Guadix, A., & Guadix, E. M. (2014). Antioxidant Activity of Protein Hydrolysates Obtained From Discarded Mediterranean Fish Species. *Food Research International Journal*. Volume 65: 469–476
- Gelichpour, M and Shabanpour. 2011. The Investigation of Proximate Composition and Protein Solubility in Processed Mullet Fillet. *International Food Research Journal*. Vol 18 (4):1343-1347
- Hall GM, Ahmad NH. 1992. *Surimi and fish minced product*. Dalam Hall GM (editors). *Fish Processing and Technology*. New York: Blackie Academic and Professional
- Hanani E, Mun'im A, dan Sekarini R. 2005. Identifikasi Senyawa Antioksidan dalam Spons *Callyspongia* sp. Dari Kepulauan Seribu. *Majalah Ilmu Kefarmasian* 2(3):127-133.
- Hasnan, M. 1991. Pengaruh Penggunaan Enzim Papain Selama Proses Hidrolisis Kecap Ikan. Tidak Diterbitkan. *Skripsi*. Bogor: Fakultas Teknologi Pertanian Institut Pertanian Bogor.
- Hue, S.M., A.N. Boyce, and C. Somasundram. 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
- Intarasirisawat R, Benjakul S, Visessanguan W, Wu J. 2014. Effects of skipjack roe protein hydrolysate on properties and oxidative stability of fish emulsion sausage. *Food Science and Technology*. 58: 280-286.
- Irshad M, Zafaryab M, Singh M, Rizvi MMA. 2012. Comparative analysis of the antioxidant activity of *Cassia fistula* extracts. *International Journal of Medicinal Chemistry*. 2012(157125):1-6.
- 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

- Jonson, A. H., dan Peterson, M. S. 1974. *Hydrolysis, In Encyclopedia of Food Technology*. Connecticut, USA: The Avi Publishing Company, inc.
- Koesoemawardani D, Nurainy F, Hidayati S. 2011. Proses pertumbuhan hidrolisat protein ikan runcah. *Jurnal Natur Indonesia* 13: 256-261
- Kristinsson, H. G. 2007. *Aquatic food protein hydrolysates*. Di dalam: Shahidi F, editor. *Maximising the Value of Marine By-Product*. Boca Raton: CRC Press.
- Kurniawan, S. Lestari, dan S. R. J. Hanggita. 2012. Hidrolisis Protein Tinta Cumi-Cumi (*Loligo* sp.) Dengan Enzim Papain. *Fishtech*, 1 (1): 41-54.
- Kusumadjaja, A.P. & Dewi R.P. 2005. Penentuan Kondisi Optimum Enzim Papain Pepaya Burung Varietas Jawa (*Carica papaya*). *Indo Journal Chem.* 5 (2), 147-151
- Laroque, D., Chabeaud, A., & Guérard, F. (2008). *Antioxidant capacity of marine protein hydrolysates*. In J. P. Bergé (Ed.), *Added value to fisheries waste*. Kerala: Transworld Research Network (pp. 147–161).
- Liu, Z., Alexandria, C.M., Oliveira., & Su, Y.C.2010. Purification and Characterization of Pepsin Solubilized Collagen Form Skin and Connective Tissue of Giant Red Sea Cucumber (*Parastichopus Californicus*). *Journal Of Agriculture Food Chemistry*. Volume 58:1270-1274
- Luo HY, Wang B, Li ZR, Chi CF, Zhang QH, He GY. 2012. Preparation and evaluation of antioxidant peptide from papain hydrolysate of *Sphyrna lewini* muscle protein. *Food Science Technology*. 51: 281- 288.
- Marchbank T, Elia G, Play ford RJ. 2009. *Intestinal protective effect of a commercial fish protein hydrolysate preparation*. *Regul Peptides* 155: 105-109. DOI: 10.1016/j.regpep.2009.02.003
- Muljanah, I. 1991. *Dalam Perkumpulan Penelitian Pengolahan Hasil Perikanan*. Jakarta: Departemen Pertanian.
- Murray, R.K., Granner, D.K, Mayes, P.A.,& Rodwell, V.W.2003. *Biokimia Harper*. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Ed 25. Jakarta. 270.
- Najafian L dan Babji AS. 2012. A review of fishderived antioxidant and antimicrobial peptides: their production, assessment, and applications. *Peptides*. 33: 178-185. Poedjiadi A. 2006. *Dasar-dasar Biokimia*. Jakarta: UI-Press.
- Oluwaniyi OO, Dosumu OO, Awolola GV. 2017. Effect of cooking method on the proximate, amino acid, and fatty acid compositions of *Clarias gariepinus*

and *Oreochromis niloticus*. *Journal of The Turkish Chemical Society*. 4(1): 115-132

Peterson, B. R. 1981. "The Impact of the Enzymic Hydrolysis Process on Recovery and Use of Protein". Dalam Wijayanti, A. T. (Ed). "Kajian Penyaringan dan Lama Penyimpanan Dalam Pembuatan Fish Peptone Dari Ikan Selar Kuning (*Caranx leptolepis*)". Tidak Diterbitkan. *Skripsi*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.

Prakash, A., 2001, Antioxidant Activity, Medallion Laboratories Analytical Progress, vol. 19, No.2.

Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV. 1998. *Molecular and Biotechnological aspect of microbial proteases*. *Microbiol Mol Biol Review* 62:597-635.

Rooma, C. Asha., Rermi M.S., and E.V. Soniya. 2012. In Vitro Antioxidant Analysis and The DNA damage Protective Activity of Leaf Extract of The *Excoecaria agallocha* Lnn Mangrove Plant. *Journal of Molecular Biology. Gov India*

Salwanee., W.M., Wan, Aida., S. Mamot., M.Y. Maskat., S. Ibrahim. 2013. Effects of Enzyme Concentration, Temperature, Ph And Time on The Degree of Hydrolysis of Protein Extract From Viscera of Tuna (*Euthynnus Affinis*) By Using Alcalase *Jurnal Sains Malaysiana* 42(3): 279–287

Samaranayaka, A.G.P., and Li-Chan, E.C.Y. 2011. Food-derived Peptidic Antioxidants: Are View of Their Production, Assessment, and Potential Applications. *Journal of Functional Foods*. Volume 3(4) : 229–254.

Shimada, K., K. Fujikawa, K. Yahars, and T. Nakamura. 1992. Antioksidative properties of Xantan on yhe antioxidation of soy bean oil in eyelodextrin emultion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40: 945-948

Stenis, T., 1992. *Flora*. Jakarta: Pradnya Paramita.

Sulistiyarto, B. 2012. Hubungan Panjang, Berat, Faktor Kondisi, dan Komposisi Makanan Ikan Saluang (*Rasbora argyrotaenia Blkr*) di Dataran Banjir Sungai Rungan, Kalimantan Tengah. *Jurnal Ilmu Hewani Tropika* Vol. 1 (2): 62-66.

Sumardjo, D. 2006. *Pengantar Kimia*. Jakarta: Buku Kedokteran EGC.

Sunarlim, R., dan Usmiati, S. 2009. Karakteritik Daging Kambing Dengan Perendaman Enzim Papain. *Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan Dan Veteriner 2009*.

- Venugopal, V. 2006. *Seafood Processing: Adding Value Through Quick Freezing, Retortable Packaging, and Cook-Chilling*. Boca Raton: CRC Pr
- Wahyuningtyas, W.S. “Aktivitas Antioksidan Hidrolisat Protein Ikan Air Laut dan Ikan Air Tawar” *Skripsi*. Jember: Universitas Jember
- Wergendahl H, Liaset B, Gudbrandesn OA, Lied E, Escape M, Muna Z, Mork S, Berge RK. 2004. Fish protein hydrolysate reduces plasma total cholesterol, increases the proportion of HDL cholesterol and lowers acyl-CoA: Cholesterol acyltransferase activity in liver of Zucker rats. *J Nutr* 134: 1320-1327
- Winarno, F. G. 1993. *Enzim Pangan*. Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama
- Winarno, F.G. 1995. *Enzim Pangan*. Jakarta : Penerbit PT. Gramedia Pustaka Utama
- Winarno, F.G., 2002. *Kimia Pangan dan Gizi*. Jakarta : Gramedia Pustaka Utama
- Wirahadikusumah, M. 1989. *Biokimia: Protein, Enzim dan Asam Nukleat*. Bandung: ITB.Press.
- Witono, Y., 2002a. Isolasi dan Karakterisasi Enzim Protease dari Getah Tanaman Biduri. *J. Teknologi Hasil Pertanian* 1(1), 1- 14.
- Witono, Y., 2002b. Pemanfaatan Enzim Protease dari Tanaman Biduri untuk Pengolahan Makanan. *J. Sains dan Teknologi*, 1(1): 32 - 37.
- Witono, Y., Subagio, A., Windrati, W.S., Hartanti, S. dan Praptiningsih, J. 2004. *Protease dari Getah Biduri*, Prosiding Seminar Nasional, Perhimpunan Ahli Teknologi Pangan Indonesia, Jakarta 14-15 Desember 2004.
- Witono, Y. Aulanni'am, Subagio A dan Widjanarko, S.B. 2007. Preliminary Study for Enzymatic Processing of Milkfish Hydrolysate by Using “Biduri” Protease. *Prosiding Seminar Nasional Perhimpunan Ahli Teknologi Pangan Indonsesia (PATPI)*, Bandung 17-18 Juli 2007.
- Witono, Y. 2008. Deklorofilasi Ekstrak Protease dari Tanaman Biduri (*Calotropis gigantea*) dengan Absorban Celite. *Berk Panel Hayati*. Vol 13:116-121
- Witono, Y. 2009. *Spesifitas dan Stabilitas Protese Biduri (Calotropis gigantea)*. Tidak Diterbitkan. Denpasar: Prosiding Seminar Nasional Perhimpunan Ahli Teknologi Pangan (PATPI)
- Witono, Y., Windrati, W.S., Taruna, I., Afriliana, A., dan Assadam, A. 2014b. Production and Characterization of Protein Hidrolyzate from “Bibisan Fish” (*Apogon albimaculosus*) as an Indigenous Flavor by Enzymatic

Hydrolysis. *Advanced Journal of Food Science and Technology*. Vol. 6 (12): 1348-1355.

Witono, Y. 2013. *Enzim Biduri: Agen Aktif Potensial untuk Proses Pangan*. Pustaka Radja. Surabaya. Pp. 104

Witono, Y., Taruna I., Windrati. W.S., Azkiyah, L. And Sari, T.N. 2016. Wader (*Rasboa jacobsoni*) Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Funcional Properties, *Agriculture and Agricultural Science Procedia* 9 (2016), 482-492

Wong DWS. 1989. *Mechanism and Theory in Food Chemistry*. New York: Van Nostrand Reinhold.

Yamamoto A. 1975. *Proteolytic Enzymes*. Di dalam: Reed G, editor. *Enzyme in Food Processing*. New York: Academic Pr.

You, H.C., Jinhae., dan Park., J.H. 2009. *Pulp And Paper Made From Rhodophyta and Manufacturing Methode Thereof*. United States Patent

Zaelani, A. 2012. *Kandungan Gizi pada Ikan*. <http://penyuluhan.kelautanperikanan.blogsopt.com/2012/06/kandungan-gizi-pada-ikan.html>.

Zayas, J.F. 1997. *Funcionally of Protein in Food*. Germany: Springer

LAMPIRAN

A. DATA HASIL ANALISIS

A.1 Aktivitas Enzim Calotropin dan Enzim Papain

Tabel A.1.1 Hasil Pengujian Aktivitas Enzim Calotropin dan Enzim Papain

| Perlakuan | Calotropin | Papain | Aquades | Tirosin |
|-----------|------------|--------|---------|---------|
| 1 | 0,560 | 2,656 | 0,225 | 0,274 |
| 2 | 0,651 | 2,454 | 0,328 | 0,245 |
| 3 | 0,590 | 2,290 | 0,065 | 0,291 |
| Rata-Rata | 0,600 | 2,467 | 0,206 | 0,261 |

Contoh Perhitungan

a. Biduri

$$UA = \frac{A_{sp} - A_{bl}}{A_{st} - A_{bl}} \times P \times 1/T$$

$$UA = \frac{0,600 - 0,206}{0,261 - 0,206} \times 2.100 \times 1/T$$

$$= \frac{0,394}{0,055} \times 2.100 \times 0,1$$

$$= 1.504,23$$

$$= 15,04$$

b. Papain

$$UA = \frac{A_{sp} - A_{bl}}{A_{st} - A_{bl}} \times P \times 1/T$$

$$UA = \frac{2,467 - 0,206}{0,261 - 0,206} \times 2.100 \times 1/T$$

$$= \frac{2,261}{0,055} \times 2.100 \times 0,1$$

$$= 8.632$$

$$= 86,32$$

A.2 Aktivitas Antioksidan Metode DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

Tabel A.2.1 Aktivitas Antioksidan Metode DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

| Sampel | Aktivitas Antioksidan % Inhibisi | | | Rata-Rata | STDEV |
|---------|----------------------------------|--------|--------|-----------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | | |
| 90C:10P | 21,70% | 25,31% | 28,77% | 25,26% | 0,035 |
| 80C:20P | 20,40% | 17,18% | 36,94% | 24,84% | 0,106 |

| | | | | | |
|---------|--------|--------|--------|--------|-------|
| 70C:30P | 18,00% | 15,33% | 49,95% | 27,76% | 0,193 |
| 60C:40P | 26,10% | 24,92% | 23,75% | 24,92% | 0,012 |
| 50C:50P | 19,90% | 26,72% | 47,41% | 31,34% | 0,143 |
| 40C:60P | 22,50% | 39,32% | 47,41% | 36,41% | 0,127 |
| 30C:70P | 28,40% | 39,34% | 33,29% | 33,67% | 0,055 |
| 20C:80P | 21,70% | 33,96% | 33,04% | 29,56% | 0,068 |
| 10C:90P | 27,80% | 14,46% | 19,39% | 20,55% | 0,067 |

Contoh Perhitungan

Diketahui :

Absorbansi blanko ($\lambda = 517 \text{ nm}$) = 0,460

Absorbansi sampel ($\lambda = 517 \text{ nm}$) = 0,350

$$\begin{aligned}
 \% \text{ Inhibisi} &= \frac{\text{Absorbansi blanko} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi blanko}} \times 100\% \\
 &= \frac{0,460 - 0,350}{0,460} \times 100\% \\
 &= \frac{0,110}{0,460} \times 100\% \\
 &= 23,91\%
 \end{aligned}$$

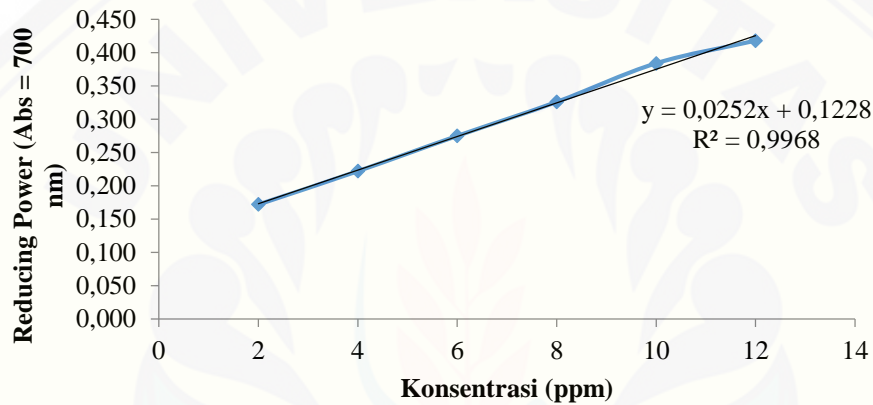
A.3 Daya Reduksi Antioksidan Metode *Reducing Power*

Tabel A.3.1 Aktivitas Antioksidan Metode *Reducing Power* HPI Wader

| Sampel | Absorbansi ($\lambda=700 \text{ nm}$) | | | Rata-Rata | STDEV |
|---------|---|-------|-------|-----------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | | |
| Blanko | 0,027 | 0,050 | 0,031 | 0,036 | 0,012 |
| 90C:10P | 0,406 | 0,37 | 0,492 | 0,423 | 0,063 |
| 80C:20P | 0,427 | 0,449 | 0,536 | 0,471 | 0,058 |
| 70C:30P | 0,425 | 0,394 | 0,626 | 0,482 | 0,126 |
| 60C:40P | 0,416 | 0,331 | 0,362 | 0,370 | 0,043 |
| 50C:50P | 0,425 | 0,51 | 0,586 | 0,507 | 0,081 |
| 40C:60P | 0,356 | 0,634 | 0,720 | 0,570 | 0,190 |
| 30C:70P | 0,389 | 0,544 | 0,461 | 0,465 | 0,078 |
| 20C:80P | 0,347 | 0,559 | 0,354 | 0,420 | 0,120 |
| 10C:90P | 0,559 | 0,304 | 0,389 | 0,417 | 0,130 |

Tabel A.3.2 Nilai Kurva Standar Asam Askorbat

| Sampel (ppm) | Nilai Absorbansi | | Rata-Rata |
|-----------------|------------------|-------|-----------|
| | 1 | 2 | |
| Blanko | 0,016 | 0,018 | 0,017 |
| 2 | 0,172 | 0,165 | 0,169 |
| 4 | 0,223 | 0,231 | 0,227 |
| 6 | 0,275 | 0,274 | 0,275 |
| 8 | 0,325 | 0,342 | 0,334 |
| 10 | 0,385 | 0,368 | 0,377 |
| 12 | 0,417 | 0,411 | 0,414 |

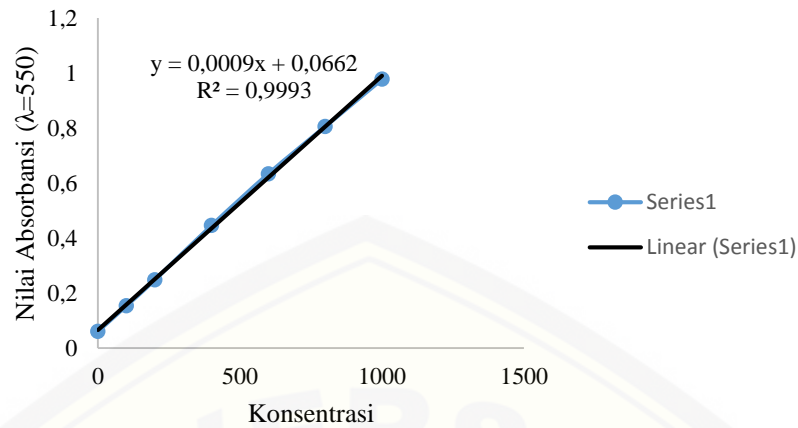


Gambar A.3.1 Kurva Standar Asam Askorbat

A.4 Kadar Protein Terlarut

Tabel A.4.1 Hasil Kadar Protein Terlarut Hidrolisat Protein Ikan Wader

| Sampel | Absorbansi ($\lambda=700$ nm) | | | Rata-Rata |
|---------|--------------------------------|-------|-------|-----------|
| | 1 | 2 | 3 | |
| 90C:10P | 18,71 | 17,47 | 14,59 | 16,92 |
| 80C:20P | 19,23 | 15,60 | 14,55 | 16,46 |
| 70C:30P | 19,78 | 16,53 | 14,57 | 16,96 |
| 60C:40P | 14,11 | 19,10 | 19,35 | 17,52 |
| 50C:50P | 7,25 | 15,85 | 13,39 | 12,16 |
| 40C:60P | 20,42 | 11,47 | 11,35 | 14,41 |
| 30C:70P | 18,37 | 15,49 | 15,50 | 16,45 |
| 20C:80P | 22,24 | 14,67 | 15,63 | 17,51 |
| 10C:90P | 18,61 | 21,41 | 15,84 | 18,62 |

Gambar A.4.1 Kurva Standar BSA (*Bovine Serum Albumin*)

Contoh perhitungan

Diketahui :

Kurva standar $y = a x + b$

$$y = 0,0009x + 0,0662$$

y = nilai absorbansi

$$a = 0,0009$$

$$b = 0,0662$$

absorbansi = $a x + b$

$$x = \frac{\text{absorbansi} - b}{a}$$

$$\text{Konsentrasi protein} = \frac{x \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \times 10 \text{ ml}}{100 \text{ mg}} \times 100\%$$

$$\text{Kombinasi enzim 20C:80P} \rightarrow x = \frac{\text{absorbansi} - b}{a}$$

$$0,0009 x = \frac{2,295 - 0,066}{0,0009}$$

$$x = 2,229$$

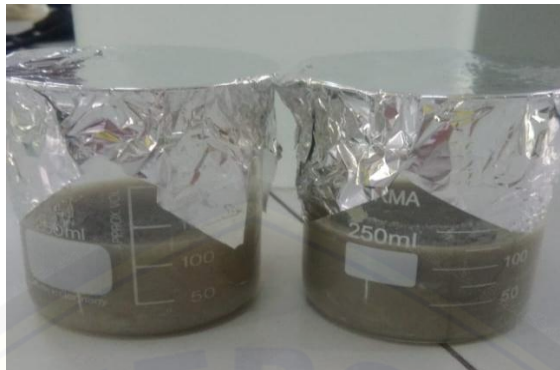
$$\text{Konsentrasi Protein} = \frac{x \cdot 10}{100} \times 100\%$$

$$= 22,29 \%$$

A.5 Daya Ikat Air

Tabel A.5.1 Hasil Daya Ikat Hidrolisat Protein Ikan Wader

| Sampel | Rata-Rata Berat Awal | Rata-Rata Berat Akhir | Air yang Hilang(%) | Daya Ikat Air (%) |
|---------|----------------------|-----------------------|--------------------|-------------------|
| Blanko | 5,10 | 1,75 | 0,34 | 99,66 |
| 90C:10P | 5,07 | 1,25 | 0,25 | 99,75 |
| 80C:20P | 5,06 | 1,31 | 0,26 | 99,74 |
| 70C:30P | 5,05 | 1,16 | 0,23 | 99,77 |
| 60C:40P | 5,09 | 1,44 | 0,28 | 99,72 |
| 50C:50P | 5,06 | 1,35 | 0,27 | 99,73 |
| 40C:60P | 5,09 | 1,23 | 0,24 | 99,76 |
| 30C:70P | 5,08 | 1,34 | 0,26 | 99,74 |
| 20C:80P | 5,04 | 1,56 | 0,31 | 99,69 |
| 10C:90P | 5,03 | 1,40 | 0,28 | 99,72 |

B. LAMPIRAN GAMBAR

1. Sampel Sebelum Proses Hidrolisis



2. Sampel Saat Proses Hidrolisis



3. Sampel Setelah Proses Hidrolisis



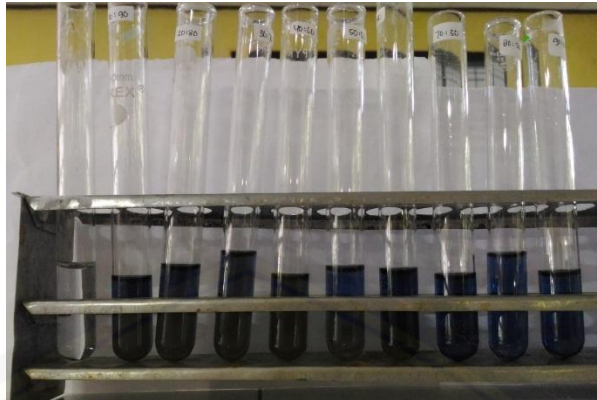
4. Proses Pengeringan Menggunakan *Freeze Dryer*



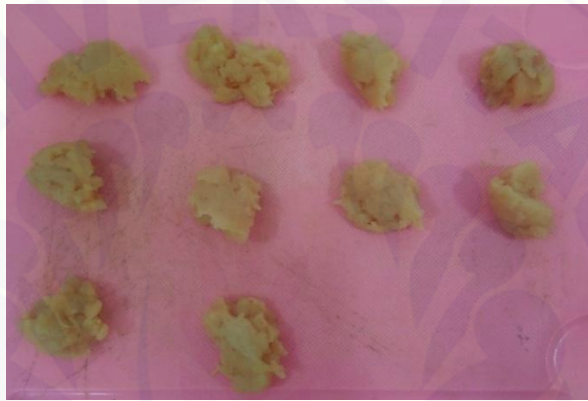
5. Uji Aktivitas Antioksidan Metode DPPH



6. Uji Daya Reduksi Antioksidan Metode *Reducing Power*



7. Uji Kadar Protein Terlarut



8. Daging Ayam Sebelum Pemasakan



9. Daging Ayam Setelah Pemasakan