



**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN HASIL HIDROLISIS PROTEIN
IKAN BANDENG (*Chanos chanos sp*) SECARA ENZIMATIS
MENGUNAKAN PROTEASE DARI TANAMAN BIDURI**

SKRIPSI

Oleh

**Lilik Krisna Mukti
NIM 141710101114**

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

2018



**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN HASIL HIDROLISIS PROTEIN
IKAN BANDENG (*Chanos chanos sp*) SECARA ENZIMATIS
MENGUNAKAN PROTEASE DARI TANAMAN BIDURI**

SKRIPSI

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

Oleh:

Lilik Krisna Mukti

141710101114

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

2018

PERSEMBAHAN

Karya tulis ini saya persembahkan kepada :

1. Allah Subahanahu Wata'ala yang telah memberikan keridhoan, Kekuatan, kemudahan, dan kelancaranNya selama penyelesaian tugas akhir ini;
2. Orang tua ku yang amat aku sayangi dan cintai, Bapak Kasim dan Ibu Atim yang selalu mendoakan dan berusaha memberikan yang terbaik untukku;
3. Kedua kakakku, Totok Heri Budi Hartono dan Luluk Rusmiati serta seluruh keluarga besarku yang selalu memberikan motivasi dan dukungannya selama ini;
4. Seluruh guruku dari Taman kanak-kanak hingga dosen di perguruan tinggi yang amat aku hormati dan hargai usahanya dalam mendidikku dengan penuh ketulusan dan kesabaran;
5. Jajaran Dekanat Fakultas Teknologi Pertanian;
6. Teman-teman FTP angkatan 2014 yang telah bersama-sama berjuang dan berlelah lelah dalam belajar selama 4 tahun ini
7. Teman-teman seperjuangan THP-C 2014 yang telah berbagi semangat dan cinta kasih persahabatan selama menimba ilmu dalam perkuliahan selama 4 tahun ini;
8. Almamater yang aku banggakan, fakultas Teknologi Pertanian, Universitas jember

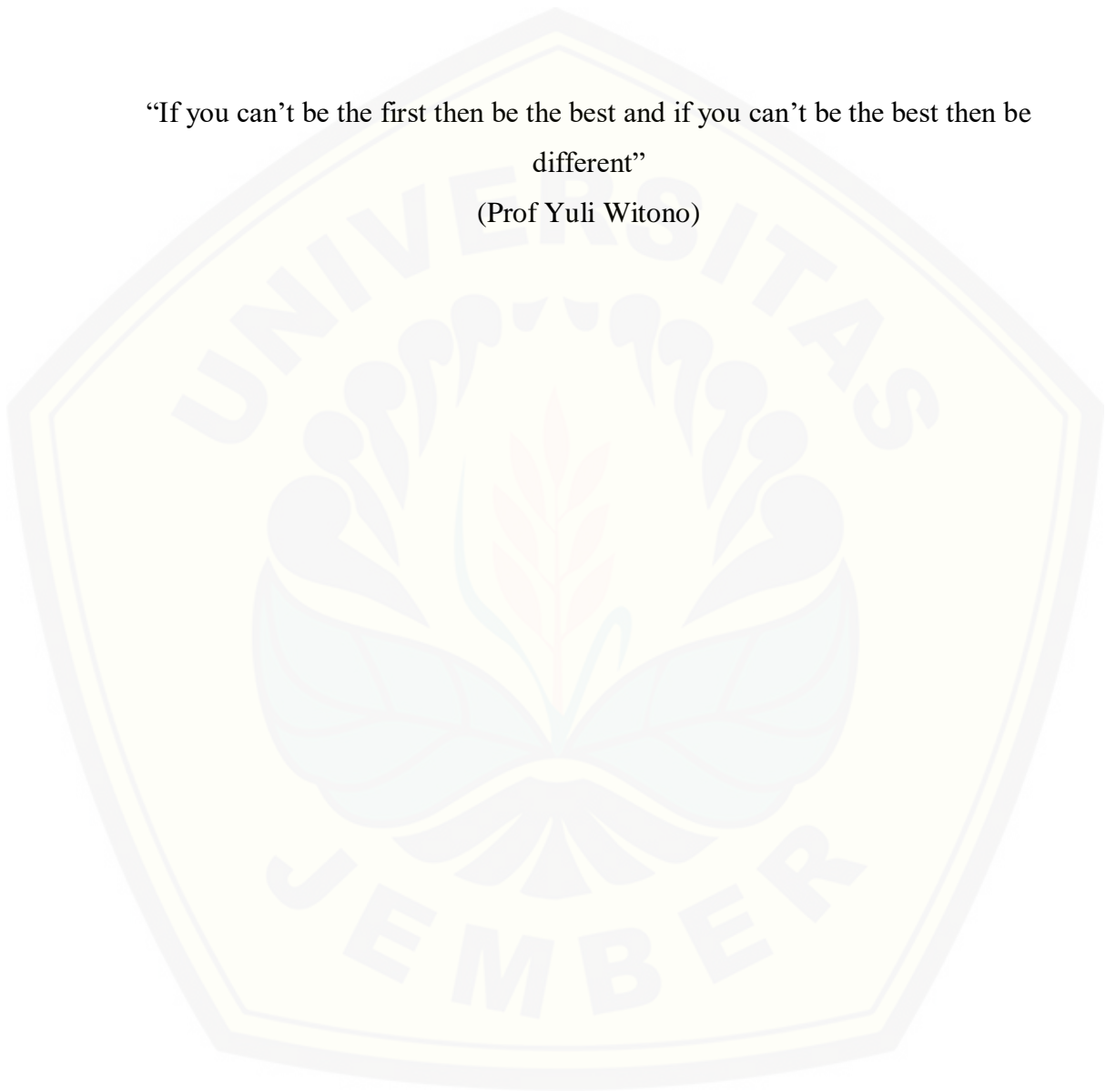
MOTO

“So verily, with the hardship, there is relief. Verily, with the hardship, there is relief”

(The meaning of Al-qur’an surah Al Insyirah, 5-6)

“If you can’t be the first then be the best and if you can’t be the best then be
different”

(Prof Yuli Witono)



PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

nama : Lilik Krisna Mukti

NIM : 141710101034

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Aktivitas Antioksidan Hasil Hidrolisis Protein Ikan Bandeng (*Chanos chanos sp*) Secara Enzimatis Menggunakan Protease Dari Tanaman Biduri” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan disebutkan sumbernya dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya tiruan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi. Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapatkan sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 11 November 2018

Yang menyatakan,

Lilik Krisna Mukti

NIM 141710101114

SKRIPSI

**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN HASIL HIDROLISIS PROTEIN
IKAN BANDENG (*Chanos chanos sp*) SECARA ENZIMATIS
MENGUNAKAN PROTEASE DARI TANAMAN BIDURI**

Oleh

Lilik Krisna Mukti

141710101114

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : **Prof. Dr. Yuli Witono., S.TP., M.P**
Dosen Pembimbing Anggota : **Andrew Setiawan R, S.TP., M.Si.**

LEMBAR PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Aktivitas Antioksidan Hasil Hidrolisis Protein Ikan Bandeng (*Chanos chanos sp*) Secara Enzimatis Menggunakan Protease Dari Tanaman Biduri”, karya Lilik Krisna Mukti (141710101114), 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.,M.P
NIP 196912121998021001

Andrew Setiawan R, S.TP., M.Si.
NIP 198204222005111002

Tim Penguji

Ketua,

Anggota,

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

Dr. Ir.Sony Suwasono, M.App.Sc
NIP 196411091989021002

Mengesahkan:

Dekan Fakultas Teknologi Pertanian
Universitas Jember

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

NIP. 196809231994031009

RINGKASAN

Aktivitas Antioksidan Hasil Hidrolisis Protein Ikan Bandeng (*Chanos chanos sp*) Secara Enzimatis Menggunakan Protease Dari Tanaman Biduri; Lilik krisna Mukti, 141710101114; 2018; halaman; Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.

Antioksidan memiliki peranan penting dalam bidang pangan dan kesehatan. hal tersebut disebabkan oleh kemampuan antioksidan dalam mencegah kerusakan bahan pangan karena reaksi oksidasi serta mencegah timbulnya penyakit degeneratif yang disebabkan oleh radikal bebas. Antioksidan mampu menangkal radikal bebas dengan mendonorkan elektron bebasnya. Salah satu sumber antioksidan alami terdapat pada hidrolisat protein ikan bandeng (*Chanos chanos sp*). Hidrolisat protein ikan bandeng mengandung komponen bioaktif yang terbukti memiliki sifat antioksidatif. Metode hidrolisis enzimatis dengan tanaman biduri terbukti cukup efektif untuk menghasilkan hidrolisat protein ikan bandeng.

Penelitian ini menggunakan rancangan *Experimental laboratory* dengan dua faktor. Faktor yang pertama merupakan variasi konsentrasi enzim biduri yang terdiri dari 4%, 5%, dan 6%. Sementara itu, faktor kedua merupakan variasi lama hidrolisis yang terdiri dari 2 jam, 4 jam, dan 6 jam. Sampel hidrolisat protein ikan bandeng dibuat dengan cara menghancurkan 50 gram daging ikan bandeng dengan penambahan air 2:1. Proses hidrolisis suspensi ikan bandeng dilakukan pada suhu 55°C dengan penambahan enzim protease biduri dan lama hidrolisis sesuai perlakuan. Hasil hidrolisis kemudian disaring dan dikeringkan dengan freezdryer. Analisis yang dilakukan pada hidrolisat protein ikan bandeng adalah kadar protein, derajat hidrolisis, Komposisi asam amino, Berat molekul, aktivitas antioksidan dengan metode DPPH, IC₅₀, dan *Reducing power*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar protein total, kadar protein terlarut dan derajat hidrolisis tertinggi masing-masing sebesar 65,69%, 0,498 mg/ml (49,77%) dan 86,33% pada kombinasi penambahan enzim biduri 4% (39 unit) dengan lama hidrolisis 2 jam. Sampel tersebut memiliki 15 jenis asam amino dan tiga terbanyak diantaranya adalah asam glutamat (12,05%), asam aspartat

(7,30%), dan lisin (6,89%). Hasil uji berat molekul menyatakan bahwa sampel dengan kadar protein tertinggi memiliki nilai 10,40 kDa dan 43,71 kDa. Sementara itu, hasil uji aktivitas antioksidan menunjukkan nilai %RSA tertinggi sebesar 33,25%, nilai IC50 sebesar 1741,66 ppm, dan nilai *Reducing Power* sebesar 0,365 pada kombinasi perlakuan penambahan enzim 4% dan lama hidrolisis 2 jam.



SUMMARY

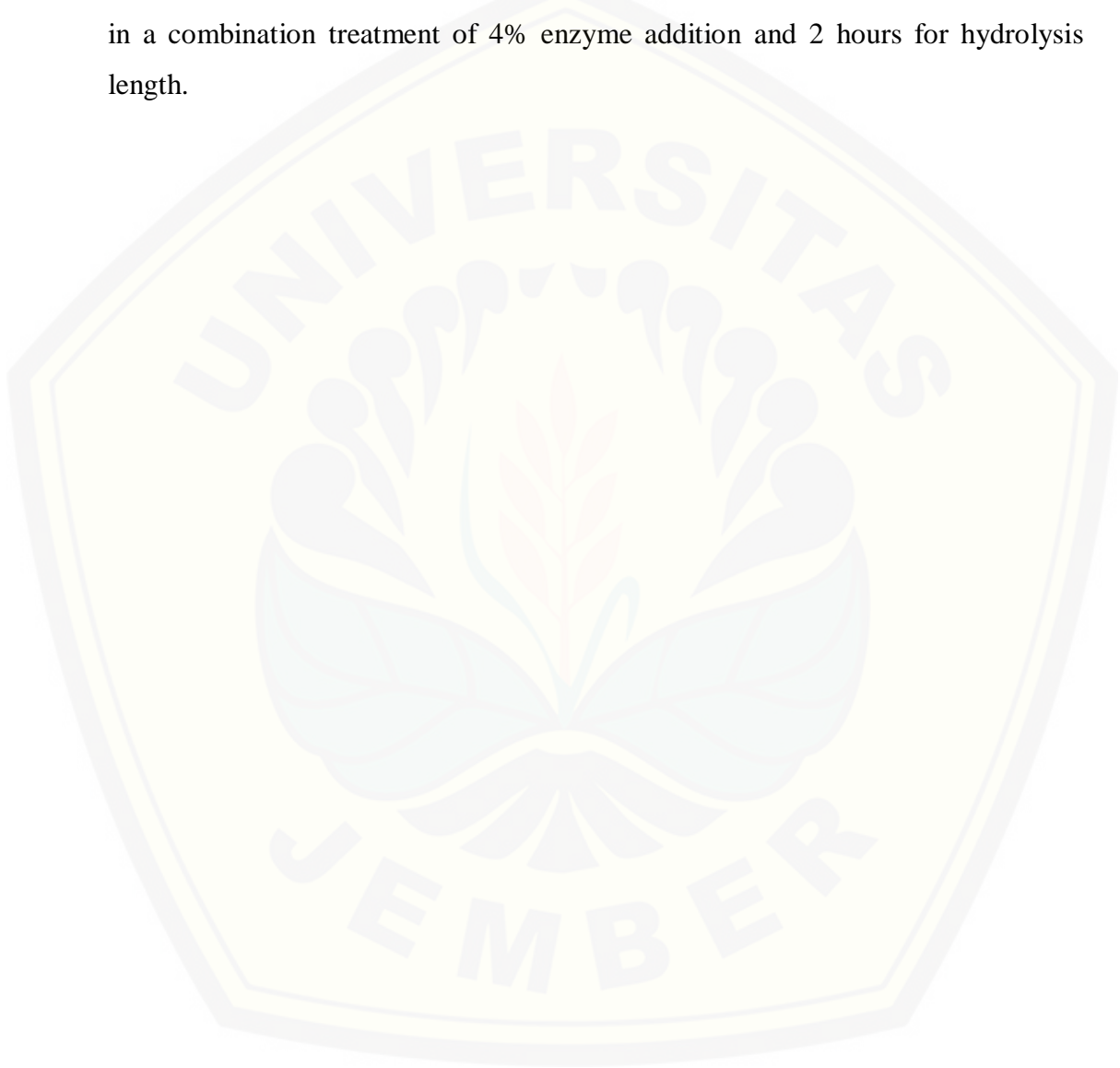
Antioxidant Activity of Milkfish (*Chanos chanos sp*) Protein Enzymatically Hydrolysis Result Using Protease from Crown Flower Plants; Lilik krisna Mukti, 141710101114; 2018; pages; Departement of Agricultural Product Technology, Faculty of Agricultural Technology, University of Jember.

Antioxidants have an important role in the field of food and health. It is caused by the ability of antioxidants to prevent food damage due to oxidation reactions and prevent degenerative diseases caused by free radicals. Antioxidants can counteract free radicals by donating free electrons. One source of natural antioxidants is the milkfish (*Chanos chanos sp*) protein hydrolyzate. The hydrolyzate of milkfish protein contains bioactive components which are proven to have antioxidative properties. The enzymatic hydrolysis method by Crown flower plants proved effective enough to produce milkfish protein hydrolyzates.

This research was carried out using experimental laboratory research design with two factors. The first factor is the variation of crown flower enzyme concentration consisting of 4%, 5%, and 6%. Meanwhile, the second factor is the variation of hydrolysis length consisting of 2 hours, 4 hours and 6 hours. The milkfish hydrolyzate protein samples were made by blanding 50 grams of milkfish meat with water addition. The hydrolysis process of milkfish suspension was carried out at 55°C with the addition of crown flower protease enzymes and hydrolysis length according to the treatment. The hydrolysis results were then filtered and dried with freeze dryer. The analysis conducted on milkfish protein hydrolysates include protein content, degree of hydrolysis, amino acid composition, molecular weight, antioxidant activity by DPPH, IC50, and Reducing power methods.

The results of this study indicate that the highest curd protein content, soluble protein and degree of hydrolysis were 65.69%, 0,498 mg/ml (49,77%) and 86.33% which obtained by using 4% (39 unit) crown flower enzyme with a hydrolysis length of 2 hours. The sample had 15 amino acids and highest three of

them were glutamic acid (12.05%), aspartic acid (7.30%), and lysine (6.89%). The molecular weight test results stated that the sample with the highest protein content scored 10.40 kDa and 43.71 kDa. Moreover, the results of the antioxidant activity test showed that 33.25% as the highest % of RSA value with the IC_{50} value about 1741.66 ppm and the Reducing Power value 0.365 that was obtained in a combination treatment of 4% enzyme addition and 2 hours for hydrolysis length.



PRAKATA

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

1. ALLAH SWT yang telah memberikan keridhoan, 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. MP., Selaku Dosen Pembimbing Akademik sekaligus Dosen Pembimbing Utama, yang selalu membimbing dengan penuh ketulusan dan totalitas, memotivasi serta selalu menjadi inspirasi dalam belajar dan berkarya;
4. Bapak Andrew Setiawan R, S.TP., M.Si., selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu dan pikiran dengan penuh kesabaran dan keikhlasan membimbing dalam perjalanan menyelesaikan skripsi ini;
5. Dr. Ir.Sih Yuwanti, M.P dan Dr. Ir.Sony Suwasono, M.App.Sc, selalu 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. Seluruh Dosen dan rekan-rekan penelitian di Kyungpook National University yang turut membantu dalam penyelesaian skripsi ini
8. Bapak Kasim dan Ibu Atim, Kedua orang tuaku tercinta dan seluruh keluarga besar yang tak pernah lelah mendoakan dan mengusahakan yang terbaik untukku;

9. Rekan-rekan penelitian yang aku banggakan yaitu Ika Wahyuni, Langit Biru, Febri Setyawan, Danar Ilma, Yuvita Lira, yang telah tulus saling membantu, menyemangati dan membuat pekerjaan di laboratorium menjadi terasa lebih ringan serta kakakku mbak Wiji Lestari, mbak Wulan Suci dan mas Sadewa yang selalu memberi arahan selama bekerja di laboratorium
10. Teman-teman THP C 2014 yang telah bersama sama merasakan suka duka di bangku perkuliahan selama menuntut ilmu di FTP UNEJ;
11. Rekan-rekan KKN 59 Desa Battal yang telah memberikan hangatnya persahabatan dan kekeluargaan selama menjalankan tugas sebagai pengabdian dalam masyarakat
12. Keluarga KPU Rempong telah menjadi keluarga kedua di Jember

Jember, 11 November 2018

Penulis

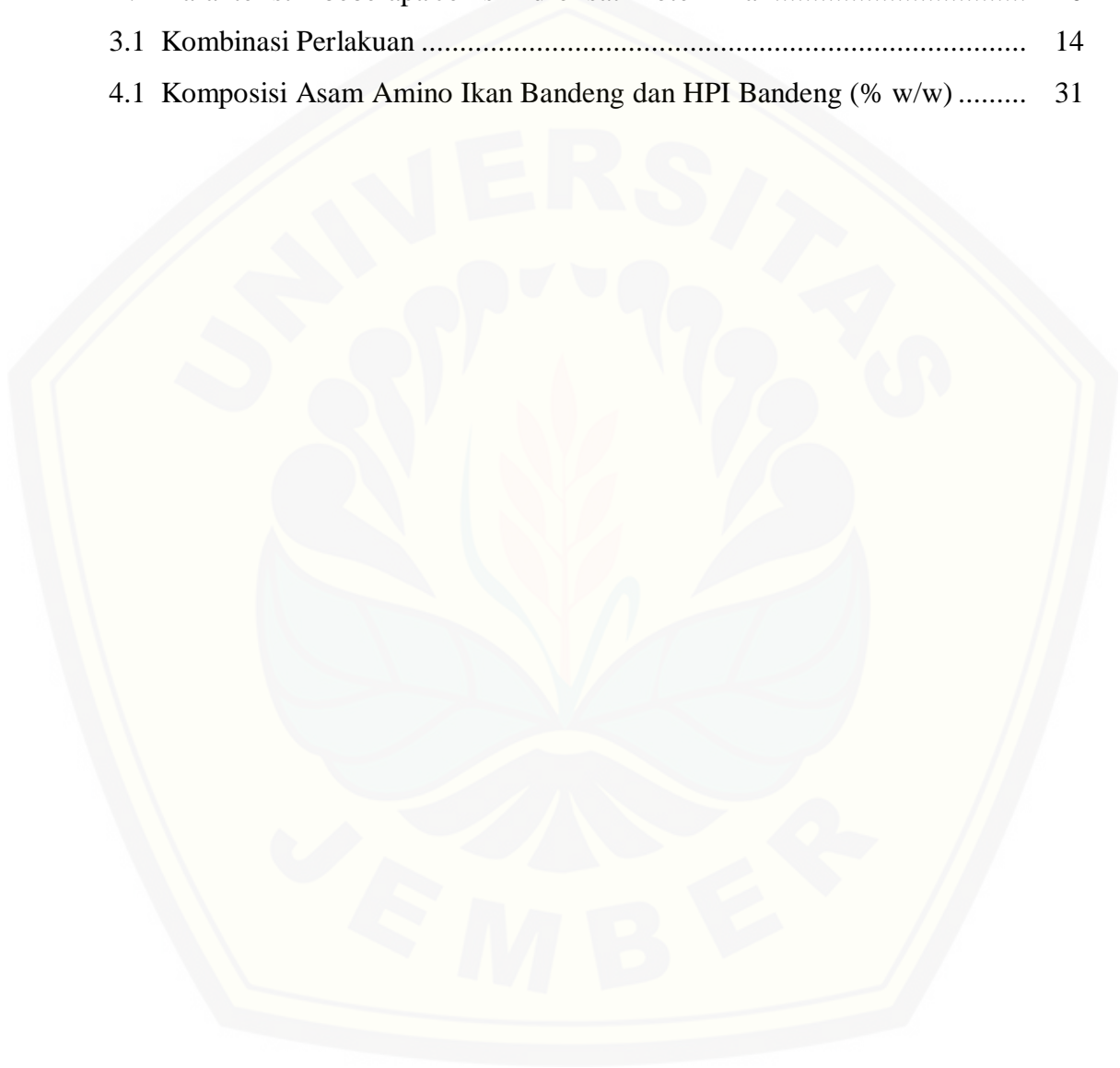
DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBING	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
SUMMARY	x
PRAKATA	xii
DAFTAR ISI	xiv
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan	3
1.4 Manfaat	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Karakteristik Ikan Bandeng	4
2.2 Protein dan Asam Amino	5
2.3 Karakteristik Enzim Protease Biduri	6
2.4 Hidrolisis Protein Ikan	8
2.5 Hidrolisat Protein Sebagai Antioksidan Alami	9
2.6 Penentuan Aktivitas Antioksidan	11
BAB 3. METODE PENELITIAN	13
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	13
3.2 Bahan dan Alat Penelitian	13
3.2.1 Bahan Penelitian	13

3.2.2 Alat Penelitian	14
3.3 Pelaksanaan Penelitian	14
3.3.1 Rancangan Penelitian	14
3.3.2 Pelaksanaan Penelitian	14
3.4 Parameter Analisis.....	17
3.5 Prosedur Analisis	17
3.5.1 Kadar Protein Total.....	17
3.5.2 Kadar Protein Terlarut.....	18
3.5.3 Derajat Hidrolisis	18
3.5.4 Komposisi Asam Amino	18
3.5.5 Berat Molekul dengan SDS-PAGE.....	20
3.5.6 Aktivitas Antioksidan.....	21
3.6 Analisis Data	23
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	24
4.1 Kadar Protein Total.....	24
4.2 Kadar Protein Terlarut	26
4.3 Derajat Hidrolisis	27
4.4 Komponen Asam Amino	30
4.5 Distribusi Berat Molekul Protein	32
4.6 Aktifitas Antioksidan Hidrolisat Protein Ikan Bandeng.....	34
4.5.1 Uji Aktivitas Antioksidan Metode DPPH (<i>2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl</i>) dan IC_{50}	34
4.5.2 Uji Aktivitas Antioksidan Metode <i>Reducing Power</i>	38
BAB 5. PENUTUP	41
5.1 Kesimpulan	41
5.2 Saran	41
DAFTAR PUSTAKA	42
LAMPIRAN	49

DAFTAR TABEL

	Halaman
A.1 Komposisi Ikan Bandeng dalam 100g	5
B.1 Karakteristik beberapa Jenis Hidrolisat Protein Ikan.....	10
3.1 Kombinasi Perlakuan	14
4.1 Komposisi Asam Amino Ikan Bandeng dan HPI Bandeng (% w/w)	31



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Bentuk Fisik Ikan Bandeng	4
2.2 Struktur Asan Amino	6
2.3 Hidrolisis Ikatan Peptida oleh Enzim Protease.....	9
3.1 Diagram Alir Prosedur Pembuatan Hidrolisat Protein Ikan Bandeng	16
4.1 Kadar Protein Total Hidrolisat Protein Ikan Bandeng	24
4.2 Kadar Protein Terlarut Hidrolisat Protein Ikan Bandeng.....	26
4.3 Derajat Hidrolisis Protein Ikan Bandeng.....	28
4.4 Berat Molekul HPI Bandeng dengan Metode SDS-PAGE	33
4.5 Aktivitas Antioksidan Hidrolisat Protein Ikan Bandeng.....	35
4.6 Kurva Hubungan Antara % Inhibisi dan Konsentrasi HPI Bandeng	37
4.7 Aktivitas Antioksidan HPI Bandeng Metode <i>Reducing Power</i>	39

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
A. Data Hasil Analisis	46
A.1 Kadar Protein Hidrolisat Protein Ikan Bandeng	46
A.2 Kadar Protein Terlarut Hidrolisat Protein Ikan Bandeng	47
A.3 Derajat Hidrolisis Hidrolisat Protein Ikan Bandeng (% wb)	48
A.4 Komposisi Asam Amino Hidrolisat Protein Ikan Bandeng	49
A.5 Distribusi Berat Molekul	50
A.6 Uji Aktivitas Antioksidan Metode DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) dan IC ₅₀	51
A.7 Uji Aktivitas Antioksidan Metode <i>Reducing Power</i>	53
A.8 Konversi Konsentrasi Enzim	54

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Antioksidan memiliki peranan penting dalam lingkup pangan dan kesehatan. Antioksidan berperan penting dalam mempertahankan mutu produk pangan dengan cara mencegah kerusakan yang diakibatkan oleh reaksi oksidasi. Sementara itu, dalam bidang kesehatan antioksidan berfungsi untuk mencegah timbulnya beberapa penyakit diantaranya kanker, tumor, dan penyempitan pembuluh darah (Tamat *et al.*, 2007).

Terdapat dua jenis antioksidan di dunia yaitu antioksidan alami dan sintesis. Antioksidan sintesis seperti BHA dan BHT ditengarai memiliki sifat sebagai penyebab kanker (karsinogenik) (Sayuti dan Yenrina, 2015). Hal tersebut mengindikasikan bahwa diperlukan adanya perluasan eksplorasi sumber antioksidan alami yang lebih aman. Salah satu sumber antioksidan alternatif yang memenuhi syarat tersebut adalah hidrolisat protein ikan. Hidrolisat protein pada umumnya digunakan sebagai bahan fortifikasi pada makanan atau minuman karena memiliki tingkat kelarutan dan daya cerna yang tinggi. Sementara itu, hidrolisat protein dari ikan dapat dikembangkan menjadi *flavor agent*. Samaranayaka dan Li-Chan (2011) menyatakan bahwa kemampuan dalam memerangkap radikal bebas, donor proton dan pengikat ion logam, menjadikan hidrolisat protein ikan sebagai salah satu sumber antioksidan alami yang potensial. Oleh karena itu, dapat dikatakan bahwa selain dapat dimanfaatkan sebagai bahan fortifikasi dan *flavor agent*, hidrolisat protein ikan juga memiliki sifat fungsional sebagai antioksidan.

Prasetio *et al.*, (2015) menyatakan bahwa protein yang terkandung pada ikan bandeng mencapai 19,39%, sehingga ikan bandeng berpotensi untuk dikembangkan sebagai sumber hidrolisat protein dan antioksidan alami. Eksplorasi sumber enzim penghidrolisis protein ikan bandeng telah dilakukan, namun analisa aktivitas antioksidan pada hasil hidrolisisnya belum pernah dilakukan. Hal penting yang perlu dipertimbangkan dalam mengetahui aktivitas



antioksidan hasil hidrolisis ikan adalah pemilihan enzim protease yang digunakan. Hal tersebut dikarenakan enzim protease akan berpengaruh pada pelepasan peptida dalam proses hidrolisis ikan (Laroque *et al.*, 2008).

Enzim protease yang banyak dimanfaatkan dalam proses hidrolisis protein ikan bandeng adalah enzim papain yang berasal dari getah buah pepaya dan enzim bromelin yang berasal dari buah nanas. Penggunaan enzim papain 5% pada proses hidrolisis ikan bandeng mampu memberikan hasil yang optimal (Wijayanti *et al.*, 2015). Sedangkan enzim bromelin mampu memberikan hasil hidrolisis protein ikan bandeng yang optimal pada konsentrasi 6% dengan lama hidrolisis 6 jam (Wijayanti *et al.*, 2016). Namun, penggunaan kedua jenis enzim tersebut masih memiliki kelemahan. Penyadapan getah pepaya untuk mendapatkan enzim papain dapat menurunkan kualitas buah pepaya segar (Witono *et al.*, 2006). Sedangkan pemanfaatan buah nanas sebagai sumber enzim bromelin akan menurunkan kuantitas buah untuk dikonsumsi dalam keadaan segar ataupun sebagai bahan dasar dalam pembuatan produk olahan nanas.

Selain kedua enzim protease tersebut, enzim protease biduri juga memiliki potensi tinggi sebagai enzim penghidrolisis protein ikan bandeng. Enzim protease biduri didapatkan dari getah tanaman biduri yang tumbuh secara liar di daerah kering dan lahan tidak produktif dengan penyinaran matahari yang cukup (Witono, 2013). Berdasarkan penelitian sebelumnya diketahui bahwa protease kasar getah biduri memiliki total aktivitas 3,5 unit/mg pada ekstraksi menggunakan amonium sulfat 65% (Witono *et al.*, 2006). Untuk mengetahui seberapa besar peran enzim protease biduri dalam menghidrolisis protein ikan bandeng sehingga diperoleh aktivitas antioksidan hidrolisat protein ikan yang tinggi, maka perlu dilakukan penelitian yang mendalam terhadap konsentrasi enzim protease biduri dan lama hidrolisis yang diperlukan. Selain itu, beberapa parameter yang dapat mendukung adanya kemampuan antioksidatif dalam hidrolisat protein ikan bandeng adalah kadar protein, derajat hidrolisis, berat molekul, dan komposisi asam amino.

1.2 Rumusan Masalah

Studi hidrolisis protein ikan bandeng dengan menggunakan enzim protease bromelin dan papain telah dilakukan. Masing-masing dari kedua enzim ini telah menunjukkan aktivitas terbaiknya pada konsentrasi yang berbeda. Namun, penggunaan enzim protease biduri pada proses hidrolisis protein ikan bandeng dimana hidrolisat yang dihasilkan berpotensi sebagai antioksidan belum pernah dilakukan. Oleh karena itu, permasalahan yang diharapkan mampu dipecahkan dalam penelitian ini adalah diketahuinya konsentrasi enzim biduri dan lama hidrolisis yang diperlukan untuk memberikan hasil hidrolisis yang optimal dan seberapa besar aktivitas antioksidan hidrolisat protein ikan bandeng yang dihasilkan.

1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Mengetahui kombinasi konsentrasi enzim biduri dan lama hidrolisis yang efektif pada produksi hidrolisat protein ikan bandeng berdasarkan parameter kadar protein dan derajat hidrolisis.
2. Mengetahui komposisi asam amino dan berat molekul hidrolisat protein ikan bandeng dari perlakuan yang paling efektif.
3. Mengetahui aktivitas antioksidan hidrolisat protein ikan bandeng hasil hidrolisis menggunakan enzim biduri

1.4 Manfaat

Manfaat yang diharapkan bisa diberikan melalui penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Dapat meningkatkan nilai ekonomi dan nilai guna ikan bandeng.
2. Dapat menjadi referensi dalam pencarian sumber antioksidan alami yang aman.
3. Menyediakan bahan tambahan pangan yang memiliki nilai tambah sebagai sumber antioksidatif alami.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Karakteristik Ikan Bandeng

Bandeng merupakan salah satu jenis ikan air payau di Indonesia. Ikan yang memiliki nama latin *Chanos chanos* ini telah banyak dibudidayakan oleh masyarakat. Tingginya kandungan protein ikan bandeng yang mencapai 19,39% (Prasetio *et al.*, 2015) memiliki peranan penting dalam pemenuhan kebutuhan protein masyarakat disamping harganya yang relatif murah. Hal tersebut yang menjadikan pembudidayaan ikan bandeng dalam upaya pemenuhan kebutuhan protein masyarakat berkembang pesat (Mas'ud, 2011). Taksonomi dan klasifikasi ikan bandeng menurut Sudrajat (2008) adalah sebagai berikut

Kingdom	: Animalia
Phylum	: Chordata
Subphylum	: Vertebrata
Class	: Osteichthyes
Ordo	: Gonorynchiformes
Family	: Chanidae
Genus	: <i>Chanos</i>
Spesies	: <i>Chanos chanos</i>
Nama dagang	: Milkfish
Nama lokal	: Bolu, muloh, ikan agam

Menurut Anwar (2014) ikan bandeng memiliki ciri-ciri bentuk tubuh memanjang dan pipih serta berbentuk torpedo, memiliki mulut agak runcing, ekor bercabang dan bersisik halus. Ikan bandeng dapat hidup pada air laut dan air payau. Ikan yang hidup secara bergerombol ini dapat dijumpai disepanjang samudra hindia dan samudra pasifik. Morfologi ikan bandeng dapat dilihat pada

Gambar 2.1



Gambar 2.1 Bentuk fisik ikan bandeng

Ikan bandeng merupakan jenis ikan air payau. Ikan ini dikenal sebagai ikan yang tinggi protein dan rendah lemak. Kadar protein yang terkandung dalam ikan bandeng mencapai 20 g dan hanya memiliki kandungan lemak sebesar 2,8 g. Komposisi gizi ikan bandeng dalam 100 gram ikan bandeng dapat dilihat pada

Tabel 2.1

Tabel 2.1 Komposisi ikan bandeng dalam 100 g

Komposisi	Jumlah
Energi	129 kkal
Protein	20 g
Lemak	2,8 g
Fosfor	150 g
Kalsium	20 g
Zat besi	2 mg
Vitamin A	50 SI
Vitamin B1	0,05 g
Air	74 g

Sumber : Saparinto (2006)

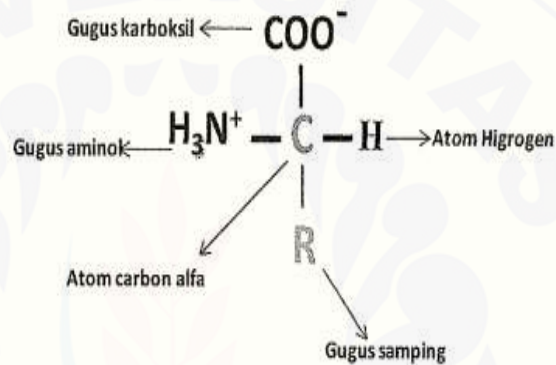
Penelitian yang dilakukan Prasetio *et al.*, (2015) memberikan hasil kadar protein yang tidak jauh berbeda yakni sebesar 19,39%. Kandungan protein yang tinggi pada ikan bandeng memiliki potensi untuk diolah menjadi hidrolisat protein ikan (HPI). Tidak hanya tingginya kadar protein yang dimiliki, namun produksi yang melimpah juga menjadi faktor pendukung potensi ikan bandeng sebagai bahan baku dalam pembuatan HPI (Wijayanti *et al.*, 2016).

2.2 Protein dan Asam Amino

Menurut Vaclavik dan Christian (2008) yang dimaksud sebagai protein adalah gabungan asam amino satu dengan asam amino lain yang diikat melalui ikatan peptida. Protein menjadi komponen yang sangat penting dalam bahan pangan karena kandungan gizi dan sifat fungsional yang dimilikinya. Pada proses pengolahan dan penyimpanan sangat penting untuk mengetahui karakteristik protein. Hal tersebut dikarenakan karakteristik protein mempengaruhi karakteristik produk pangan yang diolah atau disimpan.

Sementara itu, Winarno (2008) menyatakan bahwa asam amino memiliki komponen penyusun yang diantaranya adalah gugus amino (NH_2), gugus karbonil

(COOH), atom hidrogen, serta gugus R yang merupakan rantai cabang. Sulfur, fosfor, dan seng sebagian besar juga terkandung dalam protein. Penjelasan mengenai asam amino dikemukakan oleh Muwarni (2010) yang menyatakan bahwa adanya gugus nitrogen berupa gugus amino ($-\text{NH}_2$), gugus karboksil ($-\text{COOH}$), sebuah atom hidrogen yang secara bersama sama terikat pada sebuah atom C atau Carbon α , serta gugus R (rantai cabang) menandai ciri ciri sebuah asam amino. Struktur asam amino dapat dilihat pada **Gambar 2.2**.



Gambar 2.2 Struktur Asam Amino (Murwani, 2010)

2.3 Karakteristik Enzim Protease Biduri

Biduri merupakan salah satu tanaman yang belum banyak dimanfaatkan. Keberadaan tanaman biduri hanya dianggap sebagai gulma dan biasa digunakan sebagai pakan ternak. Adanya aktivitas enzimatik pada ekstraksi getah tanaman biduri menjadikan tanaman biduri sebagai alternatif sumber enzim protease (Witono, 2013). Menurut Nafi *et al.* (2002) bagian tanaman biduri yang dapat menghasilkan enzim protease tertinggi adalah bagian getah tanaman.

Sebagaimana kebanyakan enzim lain diekstraksi, tahapan yang dilakukan dalam mengekstraksi enzim protease biduri tidak banyak berbeda. Adapun tahapan yang dilalui adalah penyadapan, penyaringan, pengenceran, ekstraksi, sentrifugasi, dialisis, dan pengeringan (Witono, 2013). Purifikasi merupakan tahap lanjutan setelah proses ekstraksi untuk mendapatkan enzim protease biduri yang

murni. Menurut Witono *et al.* (2007) tahapan proses purifikasi yang sesuai untuk enzim protease biduri adalah kromatografi gel filtrasi saphadex G-25 dan dilanjutkan dengan kromatografi penukar ion positif *carboxymethyl sephadex C-50*. Enzim protease hasil ekstraksi dari tanaman biduri dapat diaplikasikan untuk proses pengempukan daging, pembuatan keju, ekstraksi minyak murni (VCO), pembuatan hidrolisat protein kedelai. Enzim biduri juga dapat diimmobilisasi menggunakan *celite* sebanyak 0,8 gram *celite* untuk menjerap 0,1 gram enzim atau menggunakan *carrier agent* dekstrin dengan proporsi 0,8 sampai 1,5 gram dekstrin untuk membawa 0,1 gram enzim (Witono, 2013).

Berdasarkan hasil penelitian Witono dan Kang (2010), diketahui bahwa enzim biduri merupakan protease dengan jenis eksopeptidase. Cara kerja enzim jenis eksopeptidase adalah memotong polipeptida protein pada bagian ujung. Hasil pemotongan ini akan didapat peptide rantai panjang dan asam amino. Menurut Lin *et al* (2010), Protease jenis eksopeptidase baik digunakan untuk memproduksi peptida antioksidan karena memotong protein pada asam amino hidrofobik, seperti Leu, Phy, Tyr, dan lainnya.

Setiap enzim memiliki karakteristik masing-masing. Karakter unik yang dimiliki oleh enzim dapat mencerminkan tingkat ketahanannya terhadap lingkungan dan sasaran aplikasinya. Beberapa hal yang dapat mempengaruhi aktivitas enzim protease adalah

a. Suhu

Pada batas tertentu, peningkatan suhu dapat meningkatkan laju reaksi kimia antara enzim dan substrat. Namun, suhu yang terlalu tinggi dapat menurunkan aktivitas enzim disebabkan oleh denaturasi protein.

b. Termostabilitas

Termostabilitas dapat diartikan sebagai tingkat ketahanan enzim terhadap peningkatan suhu. Pada umumnya, enzim dapat mencapai aktivitas optimalnya pada suhu 30°C-40°C dan mulai rusak pada suhu diatas 45°C yang merupakan titik dimulainya denaturasi protein.

c. pH

Enzim yang merupakan jenis protein memiliki kepekaan terhadap perubahan pH. Pada umumnya enzim memiliki pH optimum pada kisaran 4,5 hingga 8,0. pH yang terlalu asam atau terlalu basa dapat menurunkan aktivitas enzim.

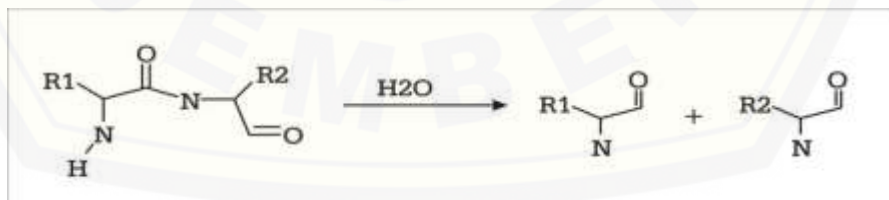
d. Konsentrasi enzim, substrat dan kinetika enzim

Enzim akan bereaksi dengan substrat dan membentuk kompleks enzim substrat. Kecepatan reaksi awal antara enzim dan substrat biasanya akan meningkat hingga mencapai nilai maksimum. Setelah mencapai nilai maksimum, kecepatan reaksi akan menurun karena enzim sudah jenuh oleh substrat.

(witono, 2013)

2.4 Hidrolisis Protein Ikan

Menurut Haslaniza *et al.* (2010), hidrolisis protein merupakan protein yang mengalami degradasi hidrolitik dengan asam, basa, atau enzim proteolitik yang menghasilkan produk berupa asam amino dan peptida. Penggunaan enzim dalam menghidrolisis protein dianggap paling aman dan menguntungkan. Hal ini disebabkan kemampuan enzim dalam menghidrolisis protein dapat menghasilkan produk hidrolisat yang terhindar dari perubahan dan kerusakan produk (Johnson dan Peterson, 1974 dalam Purbasari, 2008). 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 Hidrolisis ikatan peptida oleh enzim protease (Sumber: Witono, 2013)

Waktu hidrolisis yang lama mengakibatkan interaksi antara substrat dengan enzim semakin lama sehingga semakin meningkatkan jumlah protein sederhana

yang sangat mudah untuk larut (Jaya dan Diharnaini, 2014). 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). Hasil hidrolisis protein ikan memiliki sifat fungsionalnya lebih tinggi sehingga lebih luas pemanfaatannya. Produk tersebut lebih baik dibandingkan dari sumber hewani lainnya karena memiliki komposisi protein cukup lengkap (Koesoemawardani *et al.*, 2008).

2.5 Hidrolisat Protein Sebagai Antioksidan Alami

Hidrolisat protein didefinisikan sebagai produk yang dihasilkan dari proses penguraian protein kompleks menjadi senyawa-senyawa protein yang berantai pendek karena adanya proses hidrolisis secara enzimatis maupun dengan asam dan basa (Pigot and Tucker, 1990). Pada proses hidrolisis yang sempurna akan dihasilkan hidrolisat yang terdiri dari campuran 18 sampai 20 asam amino. Terdapat beberapa sumber untuk mendapatkan hidrolisat protein diantaranya ialah dari kacang-kacangan dan ikan. Pengolahan ikan menjadi hidrolisat protein ikan memiliki tujuan untuk mendapatkan bahan pangan yang lebih mudah dicerna oleh tubuh. Hal tersebut disebabkan oleh terurainya senyawa protein kompleks pada ikan menjadi asam-asam amino yang lebih sederhana dan mudah dicerna oleh organ pencernaan manusia (Wijayanti, 2009).

Antioksidan diartikan sebagai suatu senyawa yang dapat mencegah dan memperlambat kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas melalui penghambatan mekanisme oksidatif. Pada kadar atau jumlah tertentu antioksidan

mampu menghambat atau memperlambat kerusakan akibat proses oksidasi. Sebuah antioksidan menstabilkan radikal bebas dengan cara melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas dan menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas tanpa merubah fungsinya (Sayuti dan Yenrina, 2015).

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 Hirolisat 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).

2.6 Penentuan Aktivitas Antioksidan

2.6.1 DPPH dan IC₅₀

Aktivitas antioksidan diukur berdasarkan kemampuan dalam memerangkap radikal bebas (*radical scavenging ability*) DPPH (*1,1-diphenyl-1-2-picrylhidroksil*). DPPH adalah radikal bebas yang memiliki nitrogen tidak stabil dengan absorbansi maksimal pada panjang gelombang 517 nm dan memiliki warna biru gelap (keunguan). Keberadaan antioksidan akan menetrasi radikal DPPH dengan menyumbangkan elektron kepada DPPH sehingga menghasilkan perubahan warna dari biru pekat menjadi warna biru yang memudar sekaligus mempengaruhi nilai absorbansi. Penghilangan warna akan sebanding dengan jumlah elektron yang diambil oleh DPPH sehingga dapat diukur secara spektrofotometri (Liu *et al.*, 2010). Nilai IC₅₀ (mg / ml) digunakan untuk mengevaluasi aktivitas pemulungan CRPH. IC₅₀ didefinisikan sebagai konsentrasi sampel yang diperlukan untuk mencapai pengurangan 50% dari DPPH awal atau ABTS + konsentrasi radikal (Chalamaiah *et al.*, 2015).

2.6.2 Reducing power

Prinsip dari uji reducing power adalah zat-zat yang memiliki potensi reduksi dapat bereaksi dengan kalium *ferricyanide* (Fe³⁺) untuk membentuk *potassium ferrocyanide* (Fe²⁺). Reaksi dalam campuran tersebut ketika *ferric-chloride* (FeCl₂) ditambahkan, *potassium ferrocyanide* (Fe²⁺) akan bereaksi dan menghasilkan kompleks besi-ferrous yang maksimum diukur pada panjang gelombang 700 nm (Kalemshiya *et al.*, 2012). Pada prosesnya, antioksidan akan membentuk kompleks warna terhadap kalium ferrisianida, asam trikloroasetat dan besi (III) klorida, lalu serapan diukur pada panjang gelombang 700 nm. Peningkatan serapan pada campuran akan menunjukkan kekuatan mereduksi dari antioksidan (Joseph *et al.*, 2005).

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia dan Biokimia Hasil Pertanian, Laboratorium Rekayasa Proses Hasil Pertanian, Laboratorium Analisa Terpadu Fakultas Teknologi Pertanian, Laboratorium *Center for Development of Advanced Science and Technology* (CDAST) Universitas Jember, Laboratorium Kimia Terpadu Institut Pertanian Bogor, dan *Laboratory of Food Service Industry*, Kyungpook National University (KNU), Korea Selatan. Waktu pelaksanaan dimulai pada bulan Oktober 2017 hingga Agustus 2018.

3.2 Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1 Bahan Penelitian

Beberapa bahan utama yang diperlukan pada penelitian ini ialah ikan bandeng yang diperoleh dari pasar Tanjung Jember dan getah tanaman biduri yang diperoleh dari daerah pesisir pantai selatan Jember. Bahan kimia yang diperlukan untuk analisis yaitu buffer phosphate 0,05 M pH 7, Aquades, Kasein, Tirosin, TCA, NaOH, HCl, Na₂CO₃, Follin C, kristal *1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil* (DPPH), BSA, Na₂CO₃, Etanol P.A, Etanol, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, *Potassium Ferisianide* [K₃Fe(CN)₆], TCA, Besi Klorida (FeCl₃), Asam Askorbat, Selenium, H₂SO₄, Asam Borat, HCL, pereaksi *ortofoaleldehida* (OPA), larutan 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, Acrylamide, Coomassie Brilliant Blue (CBB), Buffer Loading (Tris-Cl 0,5 M pH 6,8, SDS 10%, Gliserol 10%, Bromophenol blue, Buffer Elektroda (SDS 0,1%, Glisin 192 mM, Trisbase 25 mM), Blue Prestained Protein Standart (BPPS) dan standar asam amino.

3.2.2 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat untuk preparasi, *food processor*, neraca digital, blender, sentrifuge (YC-1180) beserta tabung, *waterbath shaker* (GFL 1083), *freeze dryer*, Hot Plate, labu Kjeldahl, spektrofotometer (*Spectro UV Vis 2500*), destilator, serangkaian alat titrasi, *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamine type 16700) vortex, pH meter jen way type 3320, *Micro pipet*, termometer alkohol dan alat-alat gelas (Iwaki dan Pyrex).

3.3 Pelaksanaan Penelitian

3.3.1 Rancangan Penelitian

Rancangan percobaan pada penelitian ini menggunakan *experimental laboratory* dengan dua faktor. Faktor yang pertama adalah perbedaan konsentrasi enzim protease yang digunakan yaitu 4%, 5%, dan 6 %. Sedangkan faktor kedua yaitu lama waktu hidrolisis yang dilakukan selama 2, 4 dan 6 jam. Setiap perlakuan akan diulang sebanyak tiga kali. Kombinasi perlakuan yang diperoleh dari kedua faktor tersebut dapat dilihat pada **Tabel 3.1**.

Tabel 3.1 Kombinasi perlakuan

Konsentrasi enzim	Lama waktu hidrolisis		
	2 jam (B1)	4 jam (B2)	6 jam (B3)
4 % (A1)	A1B1	A1B2	A1B3
5% (A2)	A2B1	A2B2	A2B3
6% (A3)	A3B1	A3B2	A3B3

Keterangan konversi dalam satuan unit:

Aktivitas enzim biduri = 19,5 unit/ml

4% enzim = 39 unit

5% enzim = 48,75 unit

6% enzim = 58,5 unit

3.3.2 Pelaksanaan Penelitian

Pelaksanaan penelitian ini dimulai dengan melakukan persiapan penelitian. Persiapan penelitian yang dimaksud adalah menyiapkan enzim protease biduri

yang dibutuhkan dalam proses hidrolisis protein ikan bandeng. Kemudian dilakukan pembuatan hidrolisat protein ikan bandeng. Hidrolisat protein ikan bandeng yang dihasilkan selanjutnya dianalisis kadar protein, derajat hidrolisis, komposisi asam amino, distribusi berat molekul, dan aktivitas antioksidan yang meliputi uji DPPH, *reducing power*, dan uji aktivitas pengkelatan logam.

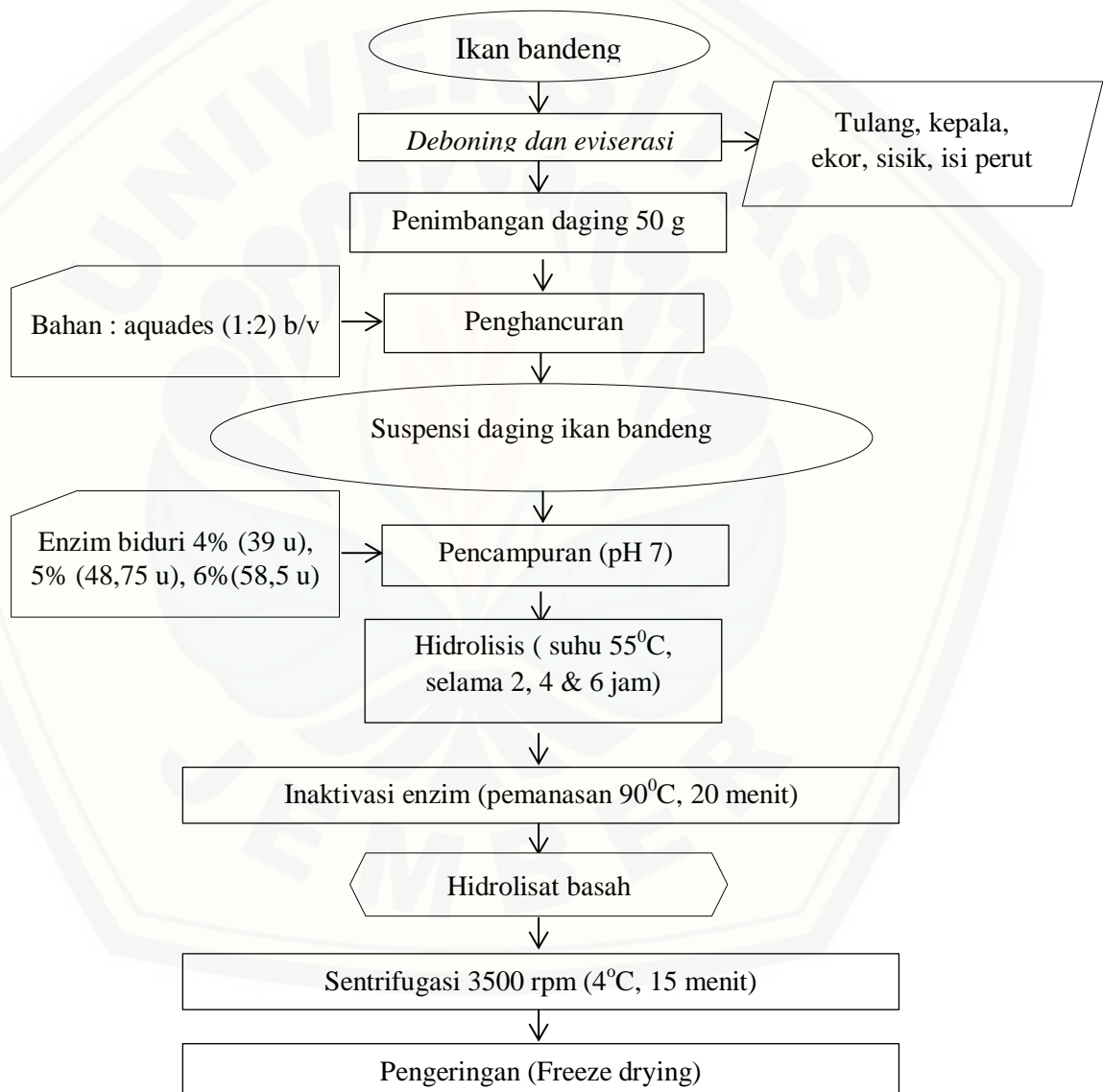
a. Persiapan penelitian

Persiapan penelitian yang dimaksud adalah pembuatan enzim protease biduri. Hal pertama yang dilakukan dalam pembuatan enzim protease biduri adalah pengambilan getah batang tanaman biduri yang masih muda. Pemanenan getah dilakukan pada waktu-waktu terbaik yaitu pagi atau sore hari. Kemudian dilanjutkan dengan pencampuran getah biduri dengan larutan buffer phospat 0,5 M pH 7. Pada penambahan larutan buffer ini menggunakan perbandingan 1 bagian getah tanaman biduri : 1 bagian buffer phospat. Larutan hasil pencampuran dikocok lalu dilakukan pemisahan antara supernatan dan endapan. Fungsi penambahan larutan buffer phospat ini adalah untuk membantu mempertahankan pH dan kondisi optimum getah tanaman biduri. Pemisahan dilakukan dengan menggunakan teknik sentrifugasi dingin pada suhu 4⁰C dengan kecepatan 8000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang diperoleh dari proses sentrifugasi adalah ekstrak kasar dari enzim protease biduri. Ekstrak kasar inilah yang kemudian digunakan untuk menghidrolisis protein ikan bandeng. Pengujian aktivitas enzim protease biduri dilakukan dengan menggunakan metode dari Walter (1984).

b. Pembuatan hidrolisat protein ikan bandeng

Proses pertama adalah *deboning* dan *eviserasi* untuk menghilangkan bagian tulang, kepala, sisik, isi perut, dan ekor. Daging yang diperoleh kemudian dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan sisa kotoran dari proses sebelumnya dan diambil sebanyak 50 gram daging ikan, kemudian ditambahkan aquades dengan perbandingan 1:2 (b/v) dan dihancurkan dengan blender. Suspensi daging ikan yang diperoleh selanjutnya ditambahkan enzim protease biduri sesuai perlakuan (4%, 5%, dan 6%). pH campuran antara

suspensi daging dan enzim diatur hingga mencapai 7. Hidrolisis dilakukan dengan menggunakan *waterbath* pada suhu 55°C selama 2, 4 dan 6 jam dan dilanjutkan inaktivasi enzim dengan pemanasan pada suhu 90°C selama 20 menit menggunakan *waterbath*. Kemudian disaring dan disentrifugasi pada suhu 4°C selama 15 menit dengan kecepatan 3.500 rpm untuk mendapatkan fraksi larutan hidrolisat protein ikan. Diagram alir pembuatan hidrolisat protein ikan bandeng dapat dilihat pada **Gambar 3.1**.



Gambar 3.1 Diagram alir prosedur pembuatan hidrolisat protein ikan bandeng modifikasi metode Hidayat (2005).

3.4 Parameter Analisis

Parameter yang diamati dari sampel hidrolisat protein ikan bandeng kering dalam penelitian ini yaitu:

1. Kadar protein total (AOAC, 1995)
2. Kadar protein terlarut (Sudarmadji *et al*, 1997)
3. Derajat hidrolisis (Hasnaliza *et al.*, 2010)
4. Komposisi asam amino (AOAC,2005)
5. Berat molekul (laemmli, 1970)
6. Aktivitas antioksidan
 - a. DPPH dan IC₅₀ (Brand *et al.*, 1995)
 - b. *Reducing Power* (Oyaizu, 1988)

3.5 Prosedur Analisis

3.5.1 Kadar Protein (AOAC, 1995)

Sebanyak 10 mg sampel dimasukkan ke dalam labu Kjeldahl 100 ml. Kemudian dilakukan penambahan 90 mg selenium dan 2 ml H₂SO₄ pekat. Selanjutnya dilakukan proses destruksi selama 1 jam pada suhu 410°C hingga diperoleh larutan yang jernih lalu didinginkan. Setelah itu, dilakukan penambahan 50 ml aquades dan 20 ml NaOH 40% dan didestilasi dengan suhu destilator 100°C. Sebelum proses destilasi dilakukan terlebih dahulu melakukan preparasi dengan menyiapkan erlenmeyer berisi 15 ml asam borat (H₃BO₃) dan dua tetes indikator metil merah metil biru (MmMb). Proses destilasi menghasilkan campuran berwarna hijau. Hasil destilat kemudian dititrasi dengan HCl 0,1 N hingga terjadi perubahan warna dari hijau menjadi biru keunguan. Catat volume titran yang terpakai dan lakukan hal yang sama dengan larutan blanco. Berikut adalah rumus dalam menghitung kadar protein.

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

$$\% \text{ kadar protein} = \%N \times \text{Faktor konversi (6,25)}.$$

3.5.2 Kadar protein terlarut (Sudarmadji *et al.*, 1997)

Prosedur analisa kadar protein terlarut menggunakan metode lowry yang terbagi menjadi dua tahap. Tahap pertama adalah pembuatan kurva standar menggunakan *Bovine Serum Albumine* (BSA) dengan berbagai konsentrasi. Tahap kedua adalah pengujian sampel hidrolisat protein dengan melarutkan 0,1 gram sampel dalam 10 ml aquades. Larutan tersebut kemudian di sentrifuse selama 5 menit. Filtrat hasil sentrifuse diambil sebanyak 0,125 ml dan direaksikan dengan reagen Mix-lowry dan disimpan dalam kondisi gelap selama 10 menit. Selanjutnya campuran tersebut ditambahkan 0,25 ml follin dan disimpan kembali selama 30 menit. Sampel yang telah didiamkan tersebut ditambahkan aquades hingga volume 5 ml dan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer ($\lambda=750$ nm).

3.5.3 Derajat Hidrolisis (Hasnaliza *et al.*, 2010)

Sebanyak 10 ml sampel hidrolisat protein ditambahkan TCA (*trichloroacetic acid*) 10% (b/v). Kemudian diamkan campuran yang telah terbentuk selama 30 menit. Hal ini bertujuan agar terjadi pengendapan. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 6000 rpm. Supernatan yang dihasilkan kemudian dianalisis kadar nitrogennya menggunakan metode semi mikro Kjeldahl metode AOAC (1995). Berikut adalah rumus untuk menghitung derajat hidrolisis.

$$\% \text{ Hidrolisis} = \frac{\text{Nitrogen terlarut dalam TCA 10\%} \left(\frac{b}{v} \right)}{\text{Nitrogen total sampel}}$$

3.5.4 Komposisi Asam Amino (AOAC, 2005)

Metode yang digunakan untuk analisa komposisi asam amino adalah AOAC (2005). Analisa ini menggunakan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) dengan mereaksikan *ortoftalaldehida* (OPA) dengan

asam amino primer dalam suasana basa. Terdapat beberapa tahapan dalam analisa komposisi asam amino dengan HPLC yaitu:

A. *Pre-treatment* sampel

Sampel yang akan diuji sebelumnya harus diketahui terlebih dahulu kadar protein yang terkandung di dalamnya. Selanjutnya, 3 mg sampel hidrolisat protein ikan bandeng ditempatkan dalam tabung ulir. Setelah itu, dilakukan penambahan 1mL HCL dan gas N₂. Proses selanjutnya adalah hidrolisis. Hidrolisis yang dilakukan menggunakan oven dengan suhu 110°C selama 24 jam. Hasil hidrolisis tersebut kemudian disaring menggunakan kaca masir sebagai bahan penyaring. Kemudian sampel dikeringkan menggunakan *rotary evaporator* dengan penambahan HCL 0,01 N dan ditera hingga 5 mL. prosedur tersebut dilanjutkan hingga tahap penyaringan menggunakan kertas malipore No.45.

B. Analisis Asam Amino menggunakan HPLC

Sampel yang telah siap ditambahkan larutan buffer kalium borat pH 10,4 dengan perbandingan 1:1. Selanjutnya 10 uL dari larutan yang didapatkan ditambah dengan 25 uL pereaksi *ortoftalaldehida* (OPA). Untuk mengetahui jenis jenis asam amino yang terkandung dalam sampel maka diperlukan larutan standar asam amino. Larutan standar asam amino tersebut disipkan dengan cara yang sama dengan sampel hidrolisat protein ikan. Masing masing dari larutan sampel dan standar yang telah tercampur dilakukan pendiaman selama 1 menit. Hal tersebut bertujuan untuk pengupayakan derivatisasi berjalan optimal. Selanjutnya, sebanyak 5 mL larutan standar diinjeksi kedalam kolom pada alat HPLC, kemudian ditunggu hingga pemisahan semua asam amino selesai. Alat HPLC yang digunakan pada saat proses harus memenuhi kondisi dimana kolom yang digunakan adalah *Ultra techspere*. Fase gerak terdiri dari dua jenis larutan. larutan A terdiri dari Na-asetat, Na-EDTA, methanol dan THF, sedangkan larutan B terdiri dari metanol 95% dan aquades. Sementara itu, detector yang digunakan adalah flouresensi. Perhitungan konsentrasi asam

amino (umol) dilakukan dengan menggunakan rumus A, sedangkan perhitungan persen asam amino dalam sampel dapat dihitung menggunakan rumus B berikut:

$$A. \text{ Konsentrasi asam amino} = \frac{\text{luas puncak sampel}}{\text{luas puncak standar}} \times \text{konsentrasi standar}$$

$$B. \% \text{ asam amino} = \frac{\text{umol} \times \text{Mr asam amino}}{\text{ug sampel}} \times 100\%$$

3.5.5 Berat molekul dengan SDS- PAGE (Laemmli, 1970)

Metode yang digunakan dalam penentuan berat molekul hidrolisat protein ini adalah SDS-PAGE (*sodium, Dodecil Sulphate Polyacrilamide gel Electrophoresis*). Untuk menentukan berat molekul dari sampel memerlukan beberapa tahapan yaitu ekstraksi protein, pengukuran kandungan protein dengan metode Bradford (1976) dan analisis SDS-PAGE. Berikut adalah penjelasan tahapan pengukuran berat molekul:

A. Ekstraksi Protein

Sampel hidrolisat protein ikan bandeng sebanyak 0.25 gram ditambahkan 750 μl buffer ekstraksi mengandung 50 mM MOPS-NaOH (pH 7,5), 1 mM EDTA, 10 mM MgCl, dan 1 mM Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride (PMSF) kemudian diberi perlakuan sonikator selama 15 menit. Homogenat yang terbentuk disentrifugasi dingin (4°C) selama 10 menit dengan kecepatan 12.000 rpm. Selain itu, untuk analisa selanjutnya Supernatan didapat dipindah ke *microtube* baru dan disimpan dalam suhu -80°C .

B. Pengukuran Kandungan Protein Metode Bradford (1976)

Sebanyak 5 μl supernatan ekstrak protein ditambah 995 μl reagen Bradford kemudian dilakukan homogenisasi menggunakan vortex dan dilanjutkan dengan inkubasi selama 15 menit. Proses tersebut akan menghasilkan perubahan warna. Selanjutnya warna yang telah terbentuk tersebut diukur menggunakan spektrofotometer ($\lambda = 595 \text{ nm}$). Perhitungan kadar protein total pada sampel dilakukan dengan cara mengkonversikan nilai absorbansi sampel

ke dalam persamaan regresi linier dari standart protein BSA. Konsentrasi protein yang dihasilkan diperlukan untuk menentukan volume sampel yang akan dianalisis.

C. Analisis SDS-PAGE

Analisis SDS-PAGE dilakukan dengan cara menambahkan *buffer loading* (Tris-Cl 0,5 M pH 6,8; SDS 10 %; *glycerol* 10 %; *bromophenol blue*) kedalam larutan hasil pengujian ekstraksi. Selanjutnya dilakukan pemanasan dengan suhu 95°C selama 3 menit agar terjadi denaturasi. Kemudian sebanyak 30 ug sampel hidrolisat protein ikan bandeng dimasukkan edalam sumuran gel dan kemudian dipisahkan menggunakan SDS-PAGE dengan konsentrasi *akrilamide* 12.5 %. Proses pemisahan protein menggunakan SDS-PAGE ini dilakukan dengan mengalirkan arus listrik 40-70 V selama 4 jam dalam buffer elektoda (*glycine* 192 mM, Tris base 25 mM, SDS 0,1 %). Setelah itu, protein yang telah terpisah diberi perlakuan pewarnaan dengan *Coomassie Brilliant Blue* (CBB). Analisa ini menggunakan Gangnam Stain Prestained Protein Ladder sebanyak 3 µl sebagai Protein marker.

3.5.6 Aktivitas Antioksidan

1. DPPH dan IC₅₀ (Brand *et al.*, 1995)

Uji ini diawali dengan menyiapkan larutan DPPH 0,1 mM dengan cara mengencerkan 0,00195 *1,1 difenil-2-pikrilhidrazil* (DPPH) kedalam 50 ml etanol p.a. Selanjutnya sampel disiapkan dengan cara mengencerkan sampel hingga 1000 ppm. Pengenceran tersebut dilakukan dengan cara melarutkan 0,01 gram sampel HPI bandeng kedalam 10 ml etanol 70%. Prosedur selanjutnya adalah mencampurkan 1,5 ml larutan sampel HPI bandeng dengan 1,5 ml larutan DPPH. Campuran tersebut kemudian divortex dan didiamkan selama 30 menit pada suhu 37°C dalam keadaan gelap. Selanjutnya larutan tersebut diabsorbansi pada panjang gelombang 515 nm untuk mengukur reduksi radikal DPPH. Perlakuan yang sama juga di lakukan pada sampel blanco. Uji DPPH pada blanco menggunakan aquades sebagai pengganti HPI

bandeng. Aktivitas *scavenging* DPPH yang tinggi didapat jika nilai absorbansi yang diperoleh rendah. Selama proses pengujian akan terjadi interaksi antara sampel HPI bandeng dengan radikal bebas DPPH. HPI bandeng yang memiliki sifat antioksidatif akan mendonorkan atom hidrogen kepada radikal bebas sehingga menjadikannya lebih stabil. Reaksi ini ditandai dengan terjadinya perubahan warna ungu yang memudar menjadi warna kuning. Perlakuan yang sama dilakukan untuk uji IC_{50} dengan membuat sampel dengan konsentrasi yang bervariasi yaitu 500, 1000, 1500, 2000, dan 2500 ppm. Pengujian pada konsentrasi yang bervariasi tersebut diperlukan untuk membentuk persamaan $y = ax + b$ dimana y bernilai 50 dan x adalah nilai absorbansi yang didapatkan dari sampel HPI bandeng. Sehingga dari persamaan tersebut akan didapat jumlah HPI bandeng yang dibutuhkan untuk menghambat radikal bebas sebesar 50%. Besaran tersebut dinyatakan dalam ppm. Berikut adalah persamaan dalam menghitung aktivitas antioksidan DPPH.

$$\text{DPPH \% penghambatan} = \frac{A \text{ blanko} - A \text{ sampel}}{A \text{ blanko}} \times 100\%$$

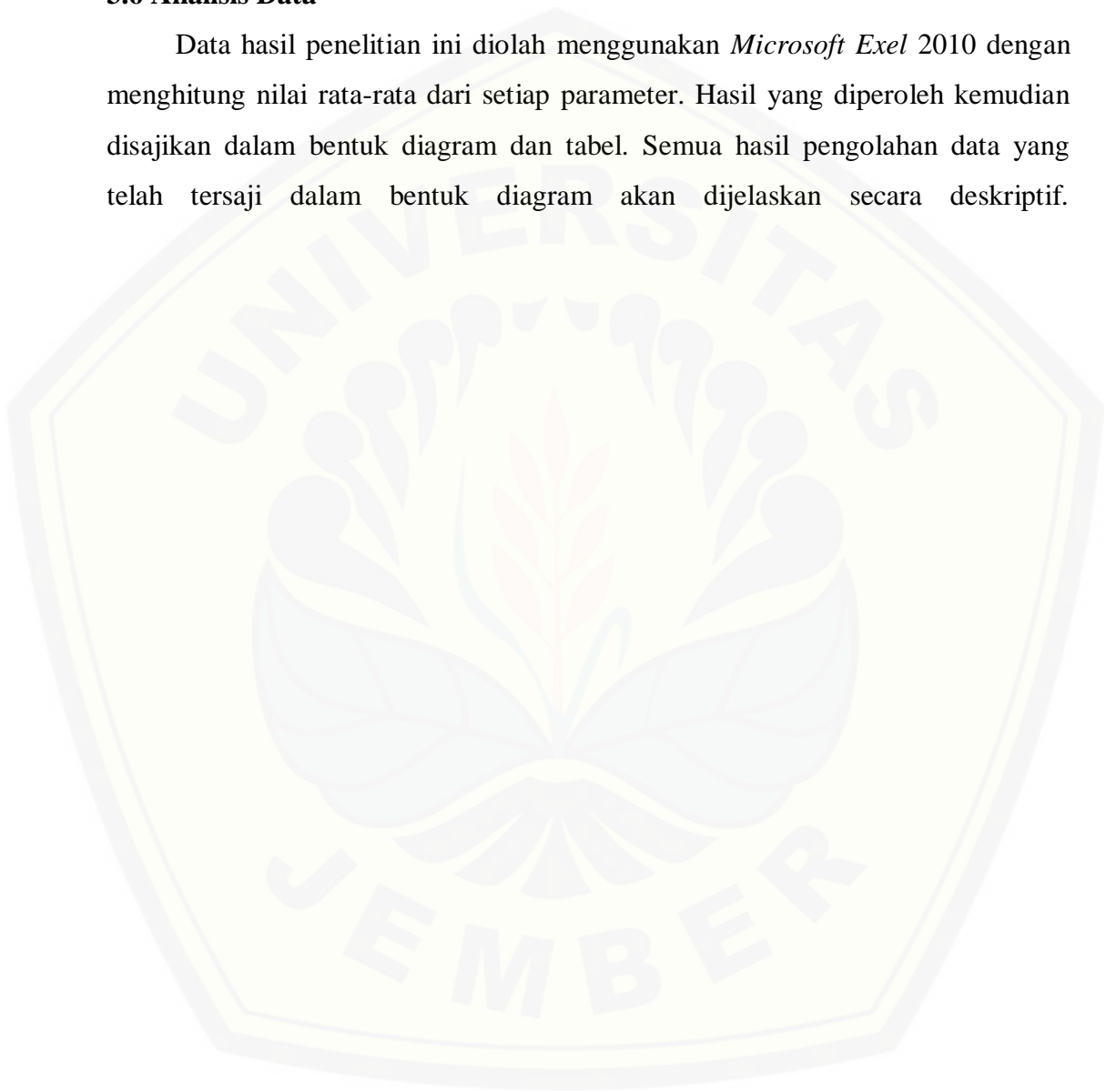
2. *Reducing Power* (Oyaizu, 1988)

Sampel HPI bandeng terlebih dahulu diencerkan menjadi 1000 ppm (0,01 g/ 10 ml). Sampel sebanyak 2 ml ditambahkan ke dalam 2 ml 0,2 mM buffer fosfat (pH 6,6) dan 2 ml kalium ferricyanide 1 %. Selanjutnya inkubasi campuran pada suhu 50⁰C selama 20 menit. Kemudian ditambahkan 2 ml TCA 2 10%. Campuran yang telah terbentuk disentrifugasi dan didiamkan dalam kondisi gelap selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk kemudian di ambil 2 ml dan dicampurkan dengan 2 ml air destilat dan 0,4 ml besi klorida 0,1 %. Selanjutnya sampel tersebut diukur absorbansinya pada panjang gelombang 700 nm. Kemampuan mereduksi suatu bahan dapat dilihat dari nilai absorbansinya. Semakin kuat sampel dalam mereduksi radikal bebas maka nilai absorbansinya juga akan semakin tinggi (Tatiya *et al.*, 2011). Sebagai pembanding juga dilakukan uji reducing power pada sampel asam askorbat dengan prosedur yang sama. Perlakuan awal yang diperlukan uji pengujian asam askorbat ini adalah membuat larutan stok sebanyak 2000 ppm (0,02 g/ 10

ml). Selanjutnya dilakukan pengenceran dengan variasi 2, 4, 6, 8, 10, 12, 20, 40, 60, 80, dan 100 ppm.

3.6 Analisis Data

Data hasil penelitian ini diolah menggunakan *Microsoft Excel* 2010 dengan menghitung nilai rata-rata dari setiap parameter. Hasil yang diperoleh kemudian disajikan dalam bentuk diagram dan tabel. Semua hasil pengolahan data yang telah tersaji dalam bentuk diagram akan dijelaskan secara deskriptif.



BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa:

1. Penambahan enzim protease biduri 4% (39 unit) dengan lama hidrolisis 2 jam menjadi kombinasi perlakuan yang efektif dilihat dari kadar protein total (65,69%), kadar protein terlarut (0,55) dan derajat hidrolisis (86,33%) yang dihasilkan.
2. HPI ikan bandeng dengan kombinasi perlakuan yang paling efektif (4%, 2 Jam) memiliki 15 macam asam amino dengan tiga jenis asam amino tertinggi yaitu asam glutamat (12,05%), asam aspartat (7,30%) dan lisin (6,89%). Selain itu HPI ikan bandeng juga memiliki distribusi berat mekul sebesar 10,40 kDa; 43,71 kDa.
3. Aktivitas antioksidan hidrolisat protein ikan bandeng dengan metode DPPH, IC_{50} dan *reducing power* memiliki nilai tertinggi berturut turut sebesar 33,25% RSA, 1741,66 ppm dan 0,365. Hasil tersebut didapat pada kombinasi perlakuan konsentrasi enzim sebesar 4% dengan lama hidrolisis 2 jam.

5.2 Saran

Selama penelitian berlangsung pastikan jumlah dan konsentrasi bahan yang digunakan sudah sesuai prosedur agar didapat data yang akurat dan presisi. Penelitian lebih lanjut terkait aktivitas antioksidan dengan metode lain seperti uji ABTS dan FRAP disarankan untuk memperkuat besaran aktivitas antioksidan yang dimiliki oleh HPI ikan bandeng. Selain itu, untuk mengetahui urutan asam amino yang memiliki sifat antioksidatif dalam penelitian ini dapat dilanjutkan dengan uji *sequencing*.

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.
- Ali. B And A. Sila. 2016. Antioxidant Peptides From Marine By-Products: Isolation, Identification and Application in Food Systems. A Review. *Journal of Functional Foods*. Volume 21: 10-26.
- Anwar, C. 2014. *Budidaya Ikan Bandeng (Chanos chanos) Pada Tambak Ramah Lingkungan*. Jakarta : WWF- Indonesia.
- AOAC. 2005. *Official Methode Analysis. Association of Official Analytical Chemists*. Washington: Benjamin Franklin Station.
- Arcan. I. and Yemeniciog. A. 2010. Effects of Controlled Pepsin Hydrolysis on Antioxidant Potential and Fractional Changes Of Chickpea Proteins. *Jounal Food Research International*. Volume 3: 140–147
- Aridita dan Yunianta. 2015. Pengaruh Suhu dan Lama Hidrolisis Enzim Papain Terhadap Sifat Kimia, Fisik Dan Organoleptik Sari Edamame. *Jurnal Pangan Dan Agroindustri*. Volume 3: 1015-1025
- Bamdad. F., Wu. J., Chen. L. 2011. Effects of Enzymatic Hydrolysis on Molecular Structure and Antioxidant Activity of Barley Hordein. *Journal of Cereal Science*. Volume 54(1): 20–28.
- Belkaaloul .A, A., Checroun. A.I Ait-Abdesalam, D. Saidi and O Kherouoa. 2010. Growth, Acidication and Proteolysis Performance of Two Co-Cultures (*Lactobacillus Plantarum*-*Bifidobacterium Longum* and *Streptococcus Thermophilus Bifido -Bacterium Longum*). *African Journal Of Biotechnology*. Volume 9(10): 1463-1469
- Bintang, Maria. 2010. *Biokimia Teknik Penelitian*. Jakarta: Erlangga (99,103-106)
- 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*. Volume 9: 15-18.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., & Berset C., 1995, Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensm. Wiss. u. Technol*. Volume 28: 25-30.
- Chalamaiah M., Jyothirmayi T., Diwan P.V., Kumar B.D. (2015): Antioxidant Activity and Functional Properties of Enzymatic Protein Hydrolysates

- From Common Carp (*Cyprinus Carpio*) Roe (Egg). *Journal of Food Science And Technoogy*. Volume 52: 5817–5825.
- Cheung.I. W.Y., Lennie K.Y. Cheung., Nina Y. Tan., Eunice C.Y. Li-Chan. 2012. The Role Of Molecular Size In Antioxidant Activity of Peptide Fractions From Pacific Hake (*Merluccius Productus*) Hydrolysates. *Journal of Food Chemistry* . Volume 134: 1297–1306
- Coligan. J., Dunn.B., Ploengh.H., Speicher. D and Wingfield.P. 2007. *Current Protocols in Protein Sciences*. New York: Vol. I. John Wiley and Sons (332-340)
- Ebrahimzadeh 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.
- Edy S., D Rosyidi., L.K. Radiati. 2018. Optimasi Aktivitas Antioksidan Peptida Aktif Dari Ceker Ayam Melalui Hidrolisis Enzim Papain. *Jurnal Ilmu Dan Teknologi Hasil Ternak*: 14-26.
- Fothergill, A.L and J. E. Fothergill, E.L. 1970.Thiol and Disulphide Contents of Hen Ovalbumin. *Journal of Biochemistry*. Volume 116: 555-561
- Gandy, JW., Madden, A., Holdsworth, M. (2014). *Gizi Dan Dietetika*. Ed 2. Jakarta: Buku Kedokteran EGC
- 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.
- Hafiludin. 2015. Analisis Kandungan Gizi Pada Ikan Bandeng Yang Berasal Dari Habitat Yang Berbeda . *Jurnal Kelautan* Issn: 1907-9931
- Hasnaliza, H., Maskat, M.Y., Wan A.W.M., Mamot, S. 2010. Effect of Enzyme Concentration, Temperature And Incubation Time on Nitrogen Content and Degree of Hydrolysis of Protein Precipate From Cockle (*Anadara Granosa*) Meat Wash Water. *International Food Reasearch journal*. Volume 12: 147-152
- Hidayat, A.A. (2005). *Model Penelitian Kesehatan*. Jakarta: PT. Rineka Cipta.
- Jaya, Hardi dan Diharnaini. 2014. Penggunaan Protease dari Getah Biduri dalam Produksi Flavor Udang Windu (*Penaeus monodon*). FMIPA- Universitas Tadulako. *Online Jurnal of Natural Science*. Volume 3(2): 39-49

- Je J.Y., Qian Z. J., Lee S.H., Byun H. G., Kim S. K. 2007. Purification and Characterization of An Antioxidant Peptide Obtained From Backbone Tuna Protein By Enzymatic Hydrolysis. *Process Biochemistry Journal*. Volume 42: 840-846
- Joseph G.S., Jayaprakasha G.K., Selvi A.T., Jena B.S., Sakariah K. 2005. Antiaflatoxicogenic And Antioxidant Activities Of *Garcinia* Extracts. *Int J Food Microbiol*. Volume 101:153–160.
- Kamleshiya, P., V.G. Meshram ., A.H. Ansari. 2012. Comparative Evaluation of Antioxidant and Free-Radical Scavenging Activity of Aqueous and Methanolic Spice Extracts. *International Journal Of Life Science And Pharma Research Issn 2250-0480*
- Klompong, V ., S. Benjakul., D. Kantachote., F. Shahidi. 2007. Antioxidative Activity and Functional Properties of Protein Hydrolysate of Yellow Stripe Trevally (*Selaroides Leptolepis*) Asinfluenced By The Degree of Hydrolysis And Enzyme Type. *Journal of Food Chemistry*. Volume 102 :1317.
- Koesoemawardani, D., Nurainy, D, Hidayati S. 2008. proses pembuatan Hidrolisat Protein Ikan Rucah. *Jurnal Natur Indonesia*. Volume 13(3) : 256-261
- Kulkarni, N.S. & Deshpande, M.S. 2007. General Enzymology. First edition. Mumbai: Himalaya Publishing House.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Journal Nature*. Volume 227: 680-685.
- 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).
- Lehninger, A.L. 1993. *Dasar- Dasar Biokimia*. Jilid 1, 2, 3. (Alih Bahasa Oleh; M. Thenawidjaja). Jakarta: Erlangga
- Liu, Z., Alexandria, C.M., Oliveira., & Su, Y.C. 2010. Purification and Characterization of Pepsin Solubilized Collagen From Skin and Connective Tissue of Giant Red Sea Cucumber (*Parastichopus Californicus*). *Journal Of Agriculture Food Chemistry*. Volume 58: 1270–1274.
- Luo, H. Y., B. Wang., Z. R. Li., C. F. Chi., Q. H. Zhang., G. Y. He. 2013. Preparation and Evaluation Of Antioxidant Peptide From Papain Hydrolysate of *Sphyrna Lewini* Muscle Protein. *Journal of Food Science And Technology Technology*. Volume 51: 281- 288
- Mas'ud, F. 2011. Prevalensi dan Derajat Infeksi *Dactylogyrus* sp. pada Insang Benih Bandeng (*Chanos chanos*) di Tambak Tradisional, Kecamatan

- Glagah, Kabupaten Lamongan. Fakultas Perikanan Universitas Islam Lamongan. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*. Volume 3 (1) : 27-39.
- Maulana, A. 2012. *Aktivitas Antioksidan Rumput Laut Eucheuma Cottonii*. Bogor: Departemen Ilmu dan Teknologi Kelautan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor
- Mendis, E., Rajapakse, N., Byun, H. G and Kim S K. 2005. Investigation of Jumbo Squid (*Dosidicus Gigas*) Skin Gelatin Peptide For Their in Vitro Antioxidant Effects. *Journal of Life Science*. Volume 77: 2166-2178.
- Muwarni, Retno, 2010. *Protein dan Asam Nukleat Edisi 1*. Semarang: Laboratorium Biokimia Nutrisi Fakultas Peternakan dan Pertanian. Universitas Diponegoro
- Nafi, A., 2002. Ekstraksi Enzim Protease dari Tanaman Biduri (*Calotropis gigantea*) dengan Pelarut Ethanol. *Skripsi*. Jember : Fakultas Teknologi Pertanian.
- Nicharee, W and Sasithorn, K. 2015. Production of Fish Protein Hydrolysates by Acid And Enzymatic Hydrolysis. *Journal of Medical and Bioengineering*. Volume 4(6): 466-470
- Nurhayati. T., Desniar., dan Made, S. 2013. Pembuatan Pepton Secara Enzimatis Menggunakan Bahan Baku Jeroan Ikan Tongkol. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia* 16(1):1-11
- Ojha, K.S ., C. Alvarez ., P. Kumar., Colm P. O'Donnell ., B. K. Tiwari. 2016. Effect of Enzymatic Hydrolysis on The Production of Free Amino Acids From Boarfish (*Capros Aper*) Using Second Order Polynomial Regression Models. *Journal of Food Science And Technology*. Volume 68 : 470-476
- Ovissipour, M., Benjakul, S., Safari, R., Motamedzadegan, A. 2010. Fish Protein Hydrolysates Production From Yellowfin Tuna *Thunnus Albacores* Head Using Alcalase And Protamex. *International Aquatic Research*, 2: 87-95.
- Oyaizu, M. 1988. Antioxidative activity of browning products of glucosamine fractionated by organic solvent and thin layer cromatography. *Journal Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaisshi*. Volume 35: 771-775
- Pigott, G. M. dan B. W. Tucker. 1990. *Seafood : Effects of Technology on Nutrition*. New York : Marcel Dekker Inc.
- Prasetio, D.Y.B, Y.S. Darmanto, F. Swastawati. 2015. Efek Perbedaan Suhu dan Lama Pengasapan Terhadap Kualitas Ikan Bandeng (*Chanos Chanos Forsk*) Cabut Duri Asap. *Jurnal Teknologi Aplikasi Pangan*. Volume 4(3): 94-98.
- Prastari,C.C., Yasni S, Nurilmala, M. 2017. Karakteristik Protein Ikan Gabus yang Berpotensi Sebagai Antihiperlipemik. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. Volume 20(2): 413-423.

- Purbasari, D. 2008. Produksi Dan Karakterisasi Hidrolisat Protein dari Kerang Mas Ngur (*Atactodea Striata*). *Skripsi*. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor.
- Ranathunga, S., Rajapakse, N., Kim, S.K. 2006. Purification and Characterization of Antioxidative Peptide Derived From Muscle Of Conger Eel (*Conger Myriaster*) *Eur Food Res Technol*. Volume 222: 310–315
- Rawung, D. L., Mangindaan, R.E.P., Posangi, J. 2016. Pemurnian dan Karakterisasi Lektin dari Alga Laut *Euclima cottonii*. *Jurnal Pesisir dan Laut Tropis*. Volume 1 (1).
- Ren, J., Zhao, M., Shi, J., Wang, J., Jiang, Y., Cui C., Kakuda, Y., Xue S. J. 2008. Optimization of Antioxidant Peptide Production From Grass Carp Sarcoplasmic Protein Using Response Surface Methodology. *LWT-Food Sci. Technol*.
- Restiani, Ratih. 2016. Hidrolisis Secara Enzimatis Protein Bungkil Biji Nyamplung (*Calophyllum inophyllum*) Menggunakan Bromelain. *Jurnal Biota*. Volume 1 (3): 103–110
- 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* Linn Mangrove Plant. *Journal of Molecular Biology*. Gov India
- Rutherford SM. 2010. Methodology For Determining Degree of Hydrolysis of Protein Hydrolysates: A Review. *Journal Of AOAC International*. Volume 93(5): 1515- 1522.
- Salwane., 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
- Tanuja, S, A., Haridas., A. A. Zynudheen., C. G. Joshy. 2014. Functional and Antioxidative Properties of Fish Protein Hydrolysate (Fph) Produced From The Frame Meat of Striped Catfish *Pangasianodon Hypophthalmus* (Sauvage, 1878) Using Alkaline Protease Alcalase. *Indian Journal Fish*. Volume 61(2) : 82-89, 2014
- 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.
- Saparinto, Cahyo., Purnomowati, Ida dan Hidayati, Diana. 2006. *Bandeng Duri Lunak*. Yogyakarta : Kanisius.
- Sayuti, K dan Yenrina, R. 2015. *Antioksidan, Alami dan Sintetik*. Andalan University Press, Padang.

- Shahidi, F., Han X. Q., Synowiecki J. 1995. Production And Characteristics of Protein Hydrolysates From Capelin (*Mallotus- Villosus*). *Journal of Food Chemistry*. Volume 53: 285–293
- Siow, H.-L., & Gan, C.-Y. 2013. Extraction of Antioxidative and Antihypertensive Bioactive Peptides From *Parkia Speciosa* Seeds. *Journal of Food Chemistry*. Volume 141(4): 3435–3442.
- Sudarmadji, S., Haryono, B., dan Suhardi. 1997. *Prosedur Analisa untuk Bahan Makanan dan Pertanian*. Yogyakarta: Liberty.
- Sudradjat, A. 2008. *Budidaya 23 Komoditas Laut Menguntungkan*. Jakarta : Penebar Swadaya.
- Tamat, S. R., T. Wikanta Dan L. S. Maulina. 2007. Aktivitas Antioksidan dan Toksisitas Senyawa Bioaktif Dari Ekstrak Rumpun Laut Hijau *Ulva Reticulata* Forsskal. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. Volume 5(1) : 31-36.
- Tatiya, A.U, Tapadiya, G.G., Kotecha, S. And Surana, S.J. 2011. Effect of Solvents on Total Phenolics, Antioxidant and Antimicrobial Properties of *Bridelia Retusa* Spreng. Stem Bark. *Indian Journal of Natural Products and Resources*. Volume 2(4): 442-447.
- Tone. 2016. Fish Protein Hydrolysates Based On Atlantic Salmon By-Products. *Dissertation*. The University Of Bergen
- Udenigwe, C.C And R. E. Aluko. 2011. Chemometric Analysis of The Amino Acid Requirements Of Antioxidant Food Protein Hydrolysates. *International Journal of Molecular Sciences*. Volume 12: 3148-3161
- Vaclavik, V.A. dan Christian, E.W. 2008. *Essentials of Food Science Third Edition*.. New York : Springer Science+Business Media, LLC
- Walter, H.E., 1984. *Method With Haemoglobin, Casein, and Azocoll As Substrate in. Bergmeyer. HU (Ed). Methods of Enzymatic Analysis*. Verlag Chemie: Deerfield Beach Florida Basel.
- Wijayanti, A.T. 2009. Kajian Penyaringan Dan Lama Penyimpanan Dalam Pembuatan Fish Peptone dari Ikan Selar Kuning (*Caranx leptolepis*). *Skripsi*. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor
- Wijayanti, 1ma., Romadhon, dan Rianingsih, Laras. 2015. Pengaruh Konsentrasi Enzim Papain Terhadap Kadar Proksimat dan Nilai Rendemen Hidrolisat Protein Ikan Bandeng. *Jurnal Pena Akuantika volime*. Volume 12 (1).
- Wijayanti, 1ma., Romadhon, dan Rianingsih, Laras. 2016. Karakteristik Hirolisat Protein Ikan Bandeng (*Chanos chanos* Forsk) Dengan Konsentrasi Enzim Bromelin yang Berbeda. *Jurnal Saintek Perikanan*. Volume 11 (2)

- Winarno, F.G. 2008. *Kimia Pangan dan Gizi: Edisi Terbaru*. Jakarta : Gramedia Pustaka Utama.
- Witono, Y., Aulanni dan Achmad S. 2007. Karakterisasi Hidrolisat Protein Kedelai Hasil Hidrolisis Menggunakan Protease Dari Tanaman Biduri. *Jurnal Penelitian Hayati*. Volume 13: 7-13.
- Witono, Y., and W.W. Kang. 2010. Specific Characteristic of Novel Cystein Protease From Indonesian 'Biduri' Plant (*Calotropis Gigantea*). *Proceeding of The Korea Food Conference And Symposium*, Incheon Korea 17-18 June 2010.
- Witono, Y., Aulanni'am, Subagio, A. dan Widjanarko, S.B. 2007. Isolasi Enzim Protease dari Getah Biduri. *Jurnal Teknologi Hasil Pertanian*. Volume 7(1) : 20-26.
- Witono, Yuli. 2013. *Enzim Biduri Agen Aktif Potensial Untuk Proses Pangan*. Surabaya : Pustaka Radja
- Witono, Yuli., Aulanni'am, Subagio, Ahmad., Wijdanarko, S.B. 2007. Purifikasi dan Karakterisari Parsial Enzim Protease Biduri (*Calotropis gigantea*). *Jurnal Teknologi Indutri Pangan*. Volume 18 : 1-19
- Witono, Y., Subagio, A., Susanto, T., Widjanarko, S.B. 2006. Membandingkan Konejra Protease Biduri Dengan Protease Komersial. *Prosiding* . Seminar Nasional – Perhimpunan Ahli Teknologi Pangan Indonesia (PATPI). Yogyakarta 2-3 Agustus 2006
- Wahyuningtyas. W.S. 2017 *Activitas Antioksidan Hidrolisat Protein Ikan Air Laut dan Ikan Air* . *Skripsi*. Fakultas Teknologi Pertanian. Universitas Jember.
- Lin., Y. J., Le. G.W., Wang . J. Y., Li . Y. X, Y. H. Shi ., Jin Sun. 2010. Antioxidative Peptides Derived From Enzyme Hydrolysis of Bone Collagen After Microwave Assisted Acid Pre-Treatment And Nitrogen Protection. *International Journal of Molecular Science*. Volume 11: 4297-4308
- You, H.C., Jinhae., dan Park., J.H. 2009. *Pulp And Paper Made From Rhodophyta and Manufacturing Methode Thereof*. United States Patent

LAMPIRAN A. DATA HASIL ANALISIS**A.1 Kadar Protein Hidrolisat Protein Ikan Bandeng****Tabel A.1.1** Hasil Pengukuran Kadar Protein HPI Bandeng (% wb)

Sampel	Kadar Protein (%)			Rata-rata	STDEV
	1	2	3		
2J/4%	65.69	65.66	65.68	65.68	0.01
2J/5%	62.69	62.16	62.42	62.42	0.26
2J/6%	61.23	59.53	60.38	60.38	0.85
4J/4%	62.25	58.66	60.45	60.45	1.79
4J/5%	60.67	56.91	58.79	58.79	1.88
4J/6%	58.78	56.03	57.40	57.40	1.37
6J/4%	59.91	57.78	58.85	58.85	1.07
6J/5%	46.11	49.90	48.01	48.01	1.90
6J/6%	35.90	32.39	34.14	34.14	1.75

Contoh Perhitungan

Diketahui:

mL blanko = 8,38 ml

mL HCl = 30,89 ml

N HCl = 0,1 N

Berat sampel = 0,3 gram

$$\begin{aligned}
 \% \text{ N} &= \frac{(\text{mL HCl} - \text{ml blanko}) \times \text{N HCl} \times 14,008}{\text{gram sampel} \times 1000} \times 100\% \\
 &= \frac{(30,89 - 8,38) \times 0,1 \times 14,008}{0,3 \times 1000} \times 100\% \\
 &= \frac{31,53}{300} \times 100\% \\
 &= 10,51\%
 \end{aligned}$$

Kadar Protein = %N X Faktor konversi

$$= 10,51 \% \times 6,25$$

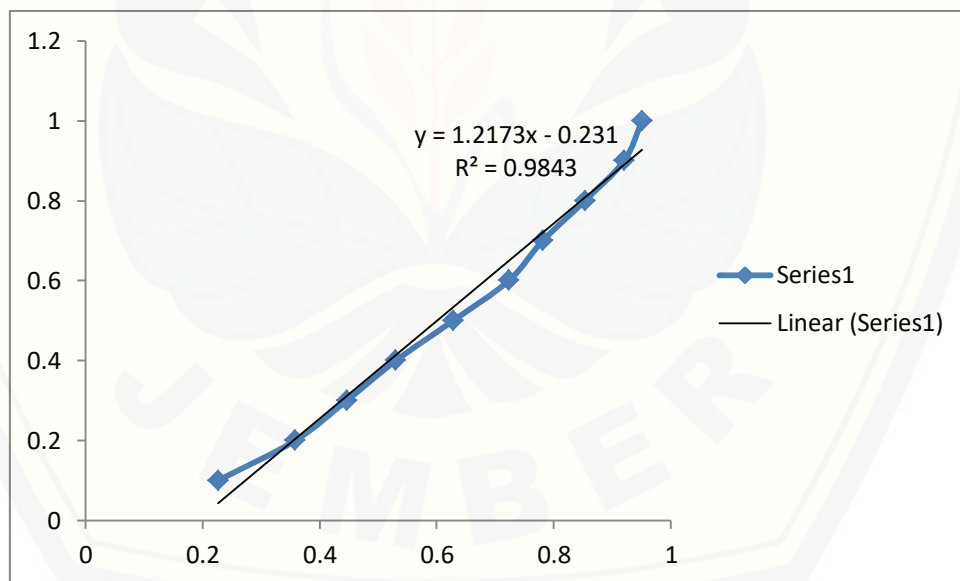
$$= 65,69$$

A.2 Kadar Protein Terlarut Hidrolisat Protein Ikan Bandeng

Tabel A.1.1 Hasil Pengukuran Kadar Protein Terlarut HPI Bandeng (% wb)

sampel	Absorbansi			ketentuan A	Ketentuan B	Kelarutan (mg/ml)			rata rata	SD
	U1	U2	U3			U1	U2	U3		
2J/4%	0.458	0.422	0.433	1.2173	0.231	0.57	0.54	0.55	0.55	0.02
2J/5%	0.313	0.292	0.314	1.2173	0.231	0.45	0.43	0.45	0.44	0.01
2J/6%	0.299	0.291	0.292	1.2173	0.231	0.44	0.43	0.43	0.43	0.00
4J/4%	0.313	0.295	0.295	1.2173	0.231	0.45	0.43	0.43	0.44	0.01
4J/5%	0.299	0.298	0.299	1.2173	0.231	0.44	0.43	0.44	0.44	0.00
4J/6%	0.285	0.279	0.292	1.2173	0.231	0.42	0.42	0.43	0.42	0.01
6J/4%	0.298	0.298	0.298	1.2173	0.231	0.43	0.43	0.43	0.43	0.00
6J/5%	0.291	0.272	0.285	1.2173	0.231	0.43	0.41	0.42	0.42	0.01
6J/6%	0.203	0.177	0.175	1.2173	0.231	0.36	0.33	0.33	0.34	0.01

Kurva Standart



4.3 Derajat Hidrolisis HPI Bandeng (% wb)

Tabel A.2.1 Hasil Pengukuran Derajat Hidrolisis HPI Bandeng (% wb)

Sampel	Ulangan			Rata-rata	STDEV
	1	2	3		
2J/4%	89.33	84.38	85.28	86.33	2.64
2J/5%	88.73	84.29	85.14	86.06	2.36
2J/6%	79.41	83.19	82.79	81.80	2.08
4J/4%	88.06	83.17	84.40	85.21	2.54
4J/5%	87.69	82.84	84.00	84.85	2.53
4J/6%	85.94	81.33	82.39	83.22	2.41
6J/4%	84.85	83.89	84.25	84.33	0.48
6J/5%	82.46	82.94	82.48	82.63	0.28
6J/6%	70.27	79.34	78.75	76.12	5.07

Contoh Perhitungan

Diketahui (Total Protein):

mL blanko = 8,38 ml

mL HCl = 30,89 ml

N HCl = 0,1 N

Berat sampel = 0,3 gram

$$\begin{aligned}
 \% \text{ N} &= \frac{(\text{mL HCl} - \text{ml blanko}) \times \text{N HCl} \times 14,008}{\text{gram sampel} \times 1000} \times 100\% \\
 &= \frac{(30,89 - 8,38) \times 0,1 \times 14,008}{0,3 \times 1000} \times 100\% \\
 &= \frac{31,53}{300} \times 100\% \\
 &= 10,51\%
 \end{aligned}$$

Diketahui (Dengan TCA 10%):

mL blanko = 8,38 ml

mL HCl = 30,89 ml

N HCl = 0,1 N

Berat sampel = 0,3 gram

$$\begin{aligned}
 \% \text{ N} &= \frac{(\text{mL HCl} - \text{ml blanko}) \times \text{N HCl} \times 14,008}{\text{gram sampel} \times 1000} \times 100\% \\
 &= \frac{(7,5 - 0,8) \times 0,1 \times 14,008}{0,1 \times 1000} \times 100\% \\
 &= 9,39\%
 \end{aligned}$$

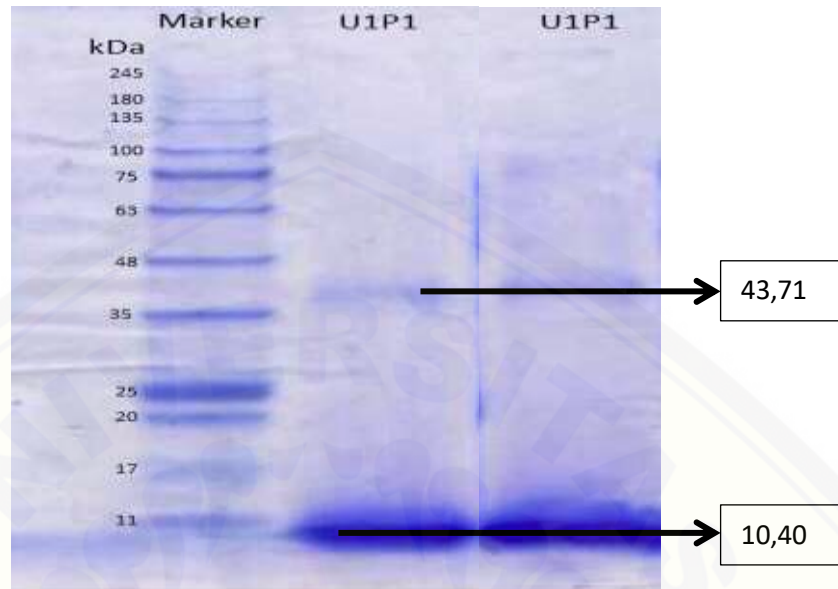
$$\begin{aligned}
 \text{Derajat Hidrolisis (\%)} &= \frac{\% \text{ N terlarut dalam TCA 10\%}}{\text{N total Sampel}} \times 100\% = \\
 &= \frac{9,39}{10,51} \times 100\% \\
 &= 89,3 \%
 \end{aligned}$$

A.3 Komposisi Asam Amino

Tabel A.3.1 Komposisi Hidrolisat Protein Ikan Bandeng Pada Sampel Dengan Kadar Protein dan Derajat Hidrolisis Tertinggi (2J/4%)

Parameter	Result	Unit	Method
Aspartic acid	7.30	% w/w	IK.LP-04.7-LT-1.0 (HPLC)
Glutamic acid	12.05	% w/w	IK.LP-04.7-LT-1.0 (HPLC)
Serine	3.00	% w/w	IK.LP-04.7-LT-1.0 (HPLC)
Histidine	2.69	% w/w	IK.LP-04.7-LT-1.0 (HPLC)
Glycine	5.10	% w/w	IK.LP-04.7-LT-1.0 (HPLC)
Threonine	3.15	% w/w	IK.LP-04.7-LT-1.0 (HPLC)
Arginine	5.23	% w/w	IK.LP-04.7-LT-1.0 (HPLC)
Alanine	5.05	% w/w	IK.LP-04.7-LT-1.0 (HPLC)
Tyrosine	2.41	% w/w	IK.LP-04.7-LT-1.0 (HPLC)
Methionine	2.18	% w/w	IK.LP-04.7-LT-1.0 (HPLC)
Valine	4.02	% w/w	IK.LP-04.7-LT-1.0 (HPLC)
Phenylalanine	2.90	% w/w	IK.LP-04.7-LT-1.0 (HPLC)
I-leucine	3.48	% w/w	IK.LP-04.7-LT-1.0 (HPLC)
Leucine	5.82	% w/w	IK.LP-04.7-LT-1.0 (HPLC)
Lysine	6.89	% w/w	IK.LP-04.7-LT-1.0 (HPLC)
Amino Acid Total	71.28	% w/w	IK.LP-04.7-LT-1.0 (HPLC)

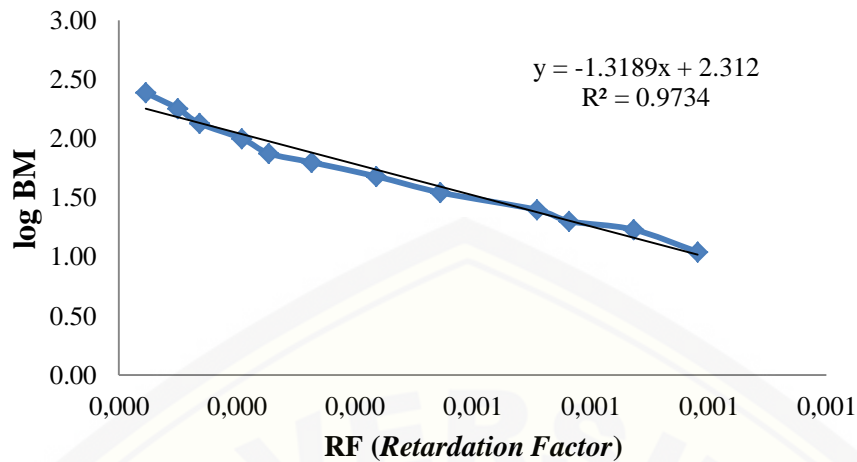
A.4 Distribusi Berat Molekul



Gambar A.4.1 Distribusi Berat Molekul Hidrolisat Protein Ikan Bandeng Pada Sampel Dengan Kadar Protein dan Derajat Hidrolisis Tertinggi (2J/4%)

Tabel A.4.1 Tabel Log Berat Molekul

Jarak total	Protein marker	Berat Molekul	Jarak tracking (cm)	RF	log BM	Y	Berat molekul
11	1	245	0.5	0.045	2.39	2.25205	178.6693
11	2	180	1.1	0.100	2.26	2.18011	151.3945
11	3	135	1.5	0.136	2.13	2.13215	135.5658
11	4	100	2.3	0.209	2.00	2.03623	108.7001
11	5	75	2.8	0.255	1.88	1.97628	94.68474
11	6	63	3.6	0.327	1.80	1.88036	75.92066
11	7	48	4.8	0.436	1.68	1.73648	54.51048
11	8	35	6	0.545	1.54	1.5926	39.13812
11	9	25	7.8	0.709	1.40	1.37678	23.81113
11	10	20	8.4	0.764	1.30	1.30484	20.17623
11	11	17	9.6	0.873	1.23	1.16096	14.48638
11	12	11	10.8	0.982	1.04	1.01708	10.40112



Gambar A.4.2 Kurva Standar Perhitungan Distribusi Berat Molekul HPI Bandeng

Contoh perhitungan

$$1. RF1 = \frac{\text{panjang pita 1}}{\text{panjang separating gel}} = \frac{5,6}{11} = 0,509$$

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

$$y = -1,3189 x + 2,312$$

$$y = -1,3189 (0,509) + 2,312$$

$$y = 1,64$$

$$y = \log BM$$

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

$$BM = \text{anti log } 1,64$$

$$BM = 43,71 \text{ kDa}$$

$$2. RF1 = \frac{\text{panjang pita 1}}{\text{panjang separating gel}} = \frac{10,8}{11} = 0,982$$

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

$$y = -1,3189 x + 2,312$$

$$y = -1,3189 (0,982) + 2,312$$

$$y = 1,017$$

$$y = \log BM$$

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

$$BM = \text{anti log } 1,017$$

$$BM = 10,40 \text{ kDa}$$

A.5 Uji Aktivitas Antioksidan Metode DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) dan IC₅₀

Tabel A.5.1 Uji Aktivitas Antioksidan Metode DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) dan IC₅₀ HPI Bandeng

Sample	Aktivitas Antioksidan (% RSA)			Rata-rata	STDEV
	1	2	3		
2J/4%	32.77608	33.28526	33.67495	33.24543	0.450759
2J/5%	28.62754	26.50404	26.44166	27.19108	1.244397
2J/6%	22.19858	22.53741	23.12866	22.62155	0.470712
4J/4%	24.44636	24.25195	25.17169	24.62333	0.484735
4J/5%	22.40356	23.74491	23.91802	23.3555	0.828934
4J/6%	22.87166	22.87591	23.25934	23.00231	0.222609
6J/4%	18.20227	19.81004	18.28212	18.76481	0.906077
6J/5%	14.48539	14.11126	14.87093	14.48919	0.37985
6J/6%	12.59559	13.70421	15.96576	14.08852	1.717643

Contoh Perhitungan

Diketahui :

Absorbansi blanko ($\lambda = 517 \text{ nm}$) = 0,663

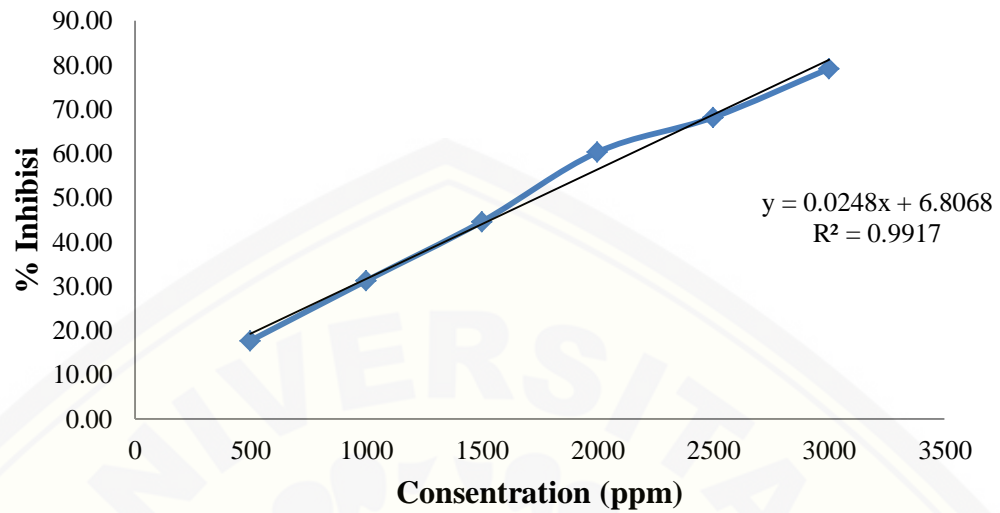
Absorbansi sampel ($\lambda = 517 \text{ nm}$) = 0,451

$$\begin{aligned}
 \% \text{ RSA} &= \frac{\text{Absorbansi blanko} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi blanko}} \times 100\% \\
 &= \frac{0,663 - 0,451}{0,663} \times 100\% \\
 &= \frac{0,212}{0,663} \times 100\% \\
 &= 32,77 \%
 \end{aligned}$$

Tabel A.5.2 Nilai IC₅₀ Hidrolisat Protein Ikan Bandeng Pada Sampel Dengan Aktivitas Antioksidan Tertinggi (2J/4%)

Sampel (ppm)	Absorbansi				Blanco	% Inhibisi
	1	2	3	Rata-rata		
3000	0.111	0.122	0.114	0.116	0.555	79.159
2500	0.130	0.213	0.186	0.177	0.555	68.168
2000	0.182	0.265	0.214	0.220	0.555	60.300
1500	0.296	0.338	0.288	0.308	0.555	44.585
1000	0.384	0.422	0.339	0.382	0.555	31.231
500	0.457	0.505	0.409	0.457	0.555	17.698

IC 50



Contoh Perhitungan

$$\begin{aligned} Y &= 0,0248X + 6,8068 \\ 50 &= 0,0248X + 6,8068 \\ 50 - 6,8068 &= 0,0248X \\ 0,0248 X &= 43,1932 \\ X &= 1741,66 \text{ ppm} \end{aligned}$$

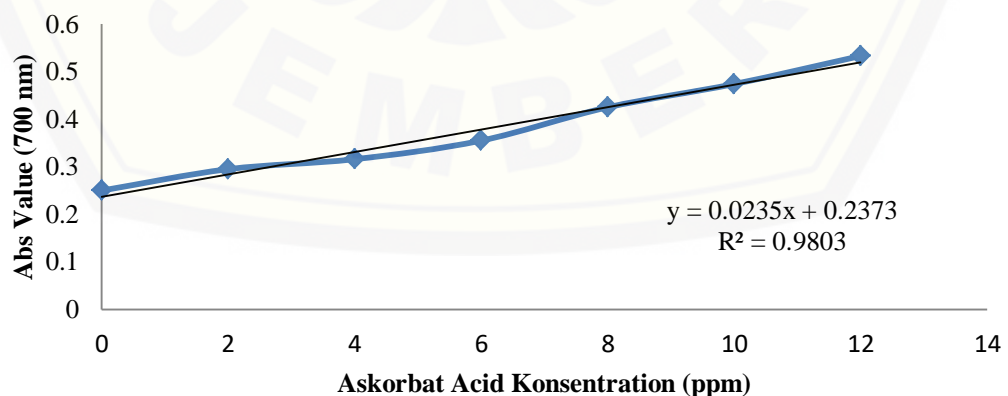
A.6 Uji Aktivitas Antioksidan Metode *Reducing Power*

Tabel A.6.1 Uji Aktivitas Antioksidan Metode *Reducing Power* HPI Bandeng

Sampel	Absorbansi ($\lambda= 700 \text{ nm}$)			Rata-rata	STDEV
	1	2	3		
Blanko	0.141	0.141	0.141	0.141	0.00
2J/4%	0.367	0.377	0.350	0.365	0.01
2J/5%	0.324	0.333	0.308	0.322	0.01
2J/6%	0.302	0.311	0.293	0.302	0.01
4J/4%	0.321	0.349	0.350	0.340	0.02
4J/5%	0.349	0.318	0.329	0.332	0.02
4J/6%	0.272	0.303	0.277	0.284	0.02
6J/4%	0.334	0.306	0.336	0.325	0.02
6J/5%	0.272	0.297	0.271	0.280	0.01
6J/6%	0.253	0.261	0.289	0.268	0.02

Tabel A.6.2 Nilai Kurva Standart Asam Askorbat

Sampel (ppm)	nilai absorbansi			rata-rata
	1	2	3	
Blanco	0.25	0.251	0.25	0.250
2	0.294	0.295	0.295	0.295
4	0.316	0.316	0.316	0.316
6	0.354	0.355	0.356	0.355
8	0.424	0.425	0.425	0.425
10	0.473	0.474	0.474	0.474
12	0.532	0.533	0.533	0.533



Gambar A.6.1 Kurva Standart Asam Askorbat

A.7 Konversi Konsentrasi Enzim

Tabel A.7.1 Konversi enzim biduri dari % ke Unit

Konsentrasi enzim (%)	Berat bahan	ml enzim	Aktivitas enzim (u/ml)	Unit enzim
4	50	2	19.5	39
5	50	2.5	19.5	48.75
6	50	3	19.5	58.5

1. Enzim Biduri 4%

$$= \% \text{ enzim} \times \text{Berat bahan}$$

$$= 4\% \times 50 \text{ gram}$$

$$= 2 \text{ ml}$$

$$\text{Unit enzim} = 2 \text{ ml} \times \text{Aktivitas enzim}$$

$$= 2 \text{ ml} \times 19,5 \text{ (u/ml)}$$

$$= 39 \text{ unit}$$

2. Enzim Biduri 5%

$$= \% \text{ enzim} \times \text{Berat bahan}$$

$$= 5\% \times 50 \text{ gram}$$

$$= 2,5 \text{ ml}$$

$$\text{Unit enzim} = 2,5 \text{ ml} \times \text{Aktivitas enzim}$$

$$= 2,5 \text{ ml} \times 19,5 \text{ (u/ml)}$$

$$= 48,75 \text{ unit}$$

3. Enzim Biduri 6%

$$= \% \text{ enzim} \times \text{Berat bahan}$$

$$= 6\% \times 50 \text{ gram}$$

$$= 3 \text{ ml}$$

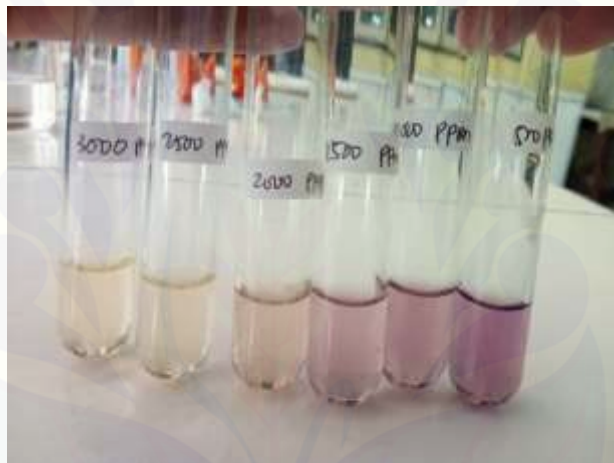
$$\text{Unit enzim} = 3 \text{ ml} \times \text{Aktivitas enzim}$$

$$= 3 \text{ ml} \times 19,5 \text{ (u/ml)}$$

$$= 58,5 \text{ unit}$$

B. Lampiran Gambar

1. Proses pengeringan menggunakan *Freeze Dryer*



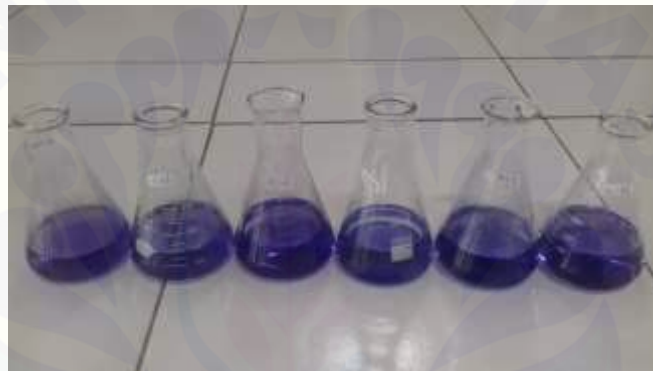
2. Pembuatan kurva standar DPPH untuk uji IC_{50}



3. Uji aktivitas antioksidan metode DPPH



4. Pembuatan kurva Standar *Reducing Power*



5. Hasil Titrasi Uji Kadar Protein