



**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN HASIL HIDROLISIS PROTEIN IKAN  
BIBISAN (*Apogon albimaculosus*) MENGGUNAKAN KOMBINASI ENZIM  
BIDURI DAN PAPAIN**

**SKRIPSI**

Oleh  
**Yolla Leonanda Winoer**  
**NIM 151710101013**

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

**2019**



**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN HASIL HIDROLISIS PROTEIN IKAN  
BIBISAN (*Apogon albimaculosus*) MENGGUNAKAN KOMBINASI ENZIM  
BIDURI DAN PAPAIN**

**SKRIPSI**

Diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Studi Teknologi Hasil Pertanian (S1) dan mencapai gelar Sarjana Teknologi Pertanian

Oleh

**Yolla Leonanda Winoer**

**NIM 151710101013**

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

**2019**

## PERSEMBAHAN

Karya tulis ini saya persembahkan kepada:

1. Allah SWT yang Maha Sempurna Pertolongannya;
2. Ayahanda Winarto dan Ibunda Nuryana, yang telah membimbing, mendidik, mendoakan, dan mencurahkan segala perhatian selama ini;
3. Adik Reymond Derbian dan Davin Reyvagio yang telah memberikan do'a, kasih sayang, dan dukungan selama ini;
4. Semua guru saya sejak TK sampai perguruan tinggi yang terhormat, telah memberikan ilmu, dukungan dan bimbingan;
5. Teman-teman THP 2015 yang telah memberikan bantuan dan dukungan selama pelaksanaan penelitian;
6. Teman-teman FTP 2015, terima kasih atas persahabatan yang terjalin selama ini;
7. Almamater Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.

**MOTTO**

“Tidak ada kesuksesan bagiku melainkan dengan pertolongan Allah”

(Qs. Huud: 88)

“Tak Peduli seberapa membahagiakan atau menyedihkan, hidup harus terus berlanjut. Waktulah yang selalu menepati janji dan berbaik hati mengobati segalanya”

(Tere Liye)

“Orang rata-rata tidak memedulikan waktu yang ada, sementara orang yang bijak menggunakan waktu dengan baik”

(Shoppenhauer)

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Yolla Leonanda Winoer

NIM : 151710101013

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “**Aktivitas Antioksidan Hasil Hidrolisis Protein Ikan Bibisan (*Apogon albimaculosus*) Menggunakan Kombinasi Enzim Biduri Dan Papain**” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, 19 Juli 2019

Yang menyatakan,

Yolla Leonanda Winoer

NIM 151710101013

**SKRIPSI**

**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN HASIL HIDROLISIS PROTEIN IKAN  
BIBISAN (*Apogon albimaculosus*) MENGGUNAKAN KOMBINASI ENZIM  
BIDURI DAN PAPAIN**

Oleh

**Yolla Leonanda Winoer**

**NIM 151710101013**

Pembimbing

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

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

**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul “**Aktivitas Antioksidan Hasil Hidrolisis Protein Ikan Bibisan (*Apogon albimaculosus*) Menggunakan Kombinasi Enzim Biduri Dan Papain**”, telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember pada:

hari, tanggal :

tempat : Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember

Dosen Pembimbing Utama

Dosen Pembimbing Anggota

**Prof. Dr. Yuli Witono, S.TP., M.P**

**Ardiyani Dwi Masahid S.TP., M.P**

NIP 196912121998021001

NIP 760016797

Tim Penguji

Penguji Utama

Penguji Anggota

**Ahmad Nafi', S.TP, M.P**

**Dr. Maria Belgis, S.TP., M.P**

NIP 197804032003121003

NIDN 0027127806

Mengesahkan

Dekan

Fakultas Teknologi Pertanian

Universitas Jember

**Dr. Siswoyo Soekarno, S.TP., M.Eng**

NIP 196809031994031009

## RINGKASAN

**Aktivitas Antioksidan Hasil Hidrolisis Protein Ikan Bibisan (*Apogon albimaculosus*) Menggunakan Kombinasi Enzim Biduri Dan Papain;** Yolla Leonanda Winoer, 151710101013; halaman; Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.

Hidrolisat protein ikan merupakan produk yang dihasilkan dari penguraian protein ikan menjadi senyawa-senyawa berantai pendek karena adanya proses hidrolisis baik oleh enzim, asam maupun basa. Penelitian yang dilakukan hidrolisat protein ikan diproduksi secara enzimatik menggunakan enzim protease biduri dan papain. Ikan yang digunakan dalam penelitian adalah ikan bibisan yang merupakan ikan yang memiliki kandungan asam amino esensial yang lengkap dan sangat diperlukan oleh tubuh manusia serta merupakan sumber antioksidan bagi tubuh. Antioksidan adalah zat yang sangat berguna bagi tubuh karena antioksidan dapat melawan pengaruh bahaya dari radikal bebas dalam tubuh. Antioksidan dalam tubuh dibutuhkan untuk menunda atau menghambat reaksi oksidasi oleh radikal bebas atau menetralkan dan menghancurkan radikal bebas yang dapat menyebabkan kerusakan sel. Tujuan dari penelitian ini adalah: 1) Mengetahui aktivitas enzim biduri dan papain, 2) Mengetahui aktivitas antioksidan hasil hidrolisis protein ikan bibisan menggunakan kombinasi enzim biduri dan papain, 3) Mengetahui potensi ikan bibisan untuk protein fungsional yang baik.

Penelitian ini dilaksanakan dalam tiga tahap, yaitu penelitian tahap I adalah pembuatan enzim biduri dan papain. Penelitian tahap II adalah pengujian analisis aktivitas antioksidan dengan metode DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) dan analisis daya reduksi antioksidan metode *Reducing Power*. Penelitian tahap III adalah pengujian sifat fungsional pada perlakuan sampel dengan aktivitas antioksidan tertinggi pada setiap jenis sampel dari penelitian tahap II menggunakan metode deskriptif.



Hasil penelitian menunjukkan bahwa pengujian antioksidan menggunakan metode DPPH memiliki hasil tertinggi pada sampel 80%B : 20%P dan pada metode *Reducing Power* memiliki nilai penghambat radikal bebas tertinggi pada sampel 80%B : 20%P. Hidrolisat protein ikan bibisan memiliki protein terlarut tertinggi pada sampel 20%B : 80%P sebesar 1,329%. Daya ikat air tanpa penambahan hidrolisat protein ikan memiliki hasil presentase daya ikat air lebih rendah dibanding dengan penambahan hidrolisat protein ikan.



## SUMMARY

**Antioxidant Activity of Protein Hydrolysis Derived from Bibisan Fish Protein (*Apogon albimaculosus*) Using a Combination of Calotropin and Papain Enzymes;** Yolla Leonanda Winoer, 151710101013; 56 pages; Department of Agricultural Product Technology, Faculty of Agricultural Technology, University of Jember.

Fish protein hydrolyzate is a product that is produced from the decomposition of fish protein into short-chain compounds because of the hydrolysis process by both enzymes, acids and bases. The research carried out is the hydrolyzate of fish protein produced enzymatically using biduri and papain protease enzymes. The fish used in the study are bibisan fish which are fish that contain essential amino acids that are complete and very needed by the human body and are a source of antioxidants for the body. Antioxidants are substances that are very useful for the body because antioxidants can fight the effects of the dangers of free radicals in the body. Antioxidants in the body are needed to delay or inhibit oxidation reactions by free radicals or neutralize and destroy free radicals that can cause cell damage. The objectives of this study are: 1) To find out the biduri and papain enzyme activities, 2) To determine the antioxidant activity of the protein hydrolysis of bibisan fish using a combination of biduri and papain enzymes, 3) Knowing the potential of bibisan fish for good functional protein.

This research is carried out in three stages. Stage 1 (introduction) is making biduri and papain enzymes, and testing biduri and papain enzyme activity. Stage II is testing the analysis of antioxidant activity using the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) method and antioxidant reduction power analysis using the Reducing Power method. Stage III is testing functional properties in the treatment of samples with the highest antioxidant activity in each type of sample from phase II research using descriptive methods.

The results showed that antioxidant testing using the DPPH method had the highest results in the 80% B: 20% P sample and the *Reducing Power* method had the highest value of free radical inhibitors in the sample of 80%B: 20%P. Hydrolysates of bibisan fish have the highest dissolved protein in the sample of 20% B : 80% P of 1.329%. The binding capacity of water without the addition of fish protein hydrolyzate has a lower percentage of water holding capacity compared to the addition of fish protein hydrolyzate.



## PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Aktivitas Antioksidan Hasil Hidrolisis Protein Ikan Bibisan (*Apogon albimaculosus*) Menggunakan Kombinasi Enzim Biduri Dan Papain”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada :

1. Dr. Siswoyo Soekarno, S.TP., M.Eng., selaku Dekan Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember;
2. Prof. Dr. Yuli Witono, S.TP., M.P. selaku Dosen Pembimbing Akademik dan Dosen Pembimbing Utama, yang telah meluangkan waktu dan pikiran dengan sabar dan tulus guna memberikan bimbingan dan pengarahan demi kemajuan, penyelesaian penelitian, dan penulisan skripsi ini;
3. Ardiyan Dwi Masahid, S.TP, M.P selaku Dosen Pembimbing Anggota, yang telah meluangkan waktu dan pikiran dengan sabar dan tulus guna memberikan bimbingan dan pengarahan demi kemajuan, penyelesaian penelitian, dan penulisan skripsi ini;
4. Ahmad Nafi, S.TP., MP dan Dr. Maria Belgis, S.TP., M.P selaku tim penguji yang telah memberikan masukan, kritik, saran serta perbaikan yang membangun dalam perbaikan penulisan skripsi ini;
5. Dr. Ir. Jayus, selaku Ketua Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember;
6. Seluruh karyawan dan teknisi Laboratorium Kimia dan Biokimia, Laboratorium Analisa Terpadu, dan Laboratorium Rekayasa Proses Pengolahan Hasil Pertanian di Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember;

7. Ayahanda Winarto, Ibunda Nuryana serta adikku Reymond Derbian dan Davin Reyvagio terima kasih atas segala doa, semangat, motivasi dan kasih sayang yang tak terhingga;
8. Rekan tim penelitian, Kinanti Cahyaningati, Kind Aisyah, Seno Putra, Dinda Aulia, dan Doni, yang telah memberikan semangat selama penelitian;
9. Sahabat-sahabat tercinta, Intan Septy, Ike Khasanatut, Diah Nurmala, yang senantiasa menemani dan memberi semangat serta doa;
10. Member JOLANGI, yang senantiasa memberi dukungan dan motivasi dari jauh;
11. Teman-teman THP A yang telah memberikan semangat, doa dan motivasi;
12. Teman-teman FTP 2015 yang telah memberikan semangat, doa dan motivasi;
13. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu, yang telah membantu penyusunan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kata sempurna dan memiliki banyak kesalahan. Penulis berharap kritik dan saran yang membangun dari pembaca demi kesempurnanya skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi penulis dan dapat menambah wawasan pembaca.

Jember, 19 Juli 2019

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL .....	i
HALAMAN SAMPUL.....	ii
PERSEMBAHAN.....	iii
MOTTO .....	iv
PERNYATAAN.....	v
SKRIPSI.....	v
PENGESAHAN.....	vii
RINGKASAN .....	viii
SUMMARY .....	x
PRAKATA .....	xii
DAFTAR ISI.....	xiv
DAFTAR GAMBAR.....	xvii
DAFTAR TABEL .....	xviii
<b>BAB 1. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Latar Belakang .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Rumusan Masalah.....</b>	<b>3</b>
<b>1.3 Tujuan .....</b>	<b>3</b>
<b>1.4 Manfaat Penelitian .....</b>	<b>3</b>
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1 Ikan Bibisan (<i>Apogon albimaculosus</i>).....</b>	<b>4</b>
<b>2.2 Enzim Protease .....</b>	<b>5</b>
2.2.1 Enzim Biduri .....	6
2.2.2 Enzim Papain .....	8
<b>2.3 Hidrolisis Protein.....</b>	<b>9</b>
<b>2.4 Hidrolisat Protein .....</b>	<b>10</b>
<b>2.5 Antioksidan .....</b>	<b>11</b>
<b>2.6 Penentuan Aktivitas Antioksidan .....</b>	<b>13</b>

2.6.1 Metode DPPH .....	13
2.6.2 Metode <i>Reducing Power</i> .....	14
<b>2.7 Faktor-Faktor Yang Mempengaruhi Proses Hidrolisis Protein ....</b>	<b>14</b>
<b>BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN .....</b>	<b>16</b>
<b>3.1 Tempat dan Waktu Penelitian .....</b>	<b>16</b>
<b>3.2 Bahan dan Alat Penelitian .....</b>	<b>16</b>
3.2.1 Bahan Penelitian .....	16
3.2.2 Alat Penelitian.....	16
<b>3.3 Tahapan Penelitian .....</b>	<b>17</b>
<b>3.4 Pelaksanaan Penelitian .....</b>	<b>17</b>
3.4.1 Penelitian Tahap I (Pendahuluan) .....	18
3.4.2 Penelitian Tahap II .....	19
<b>3.5 Variabel Pengamatan.....</b>	<b>20</b>
<b>3.6 Prosedur Analisis.....</b>	<b>20</b>
3.6.1 Uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH (2,2 diphenyl-1 picrylhydrazyl) .....	20
3.6.2 Uji daya reduksi antioksidan metode <i>Reducing Power</i> (Oyaizu, 1986) .....	21
3.6.3 Uji Sifat Fungsional .....	21
<b>3.7 Analisa Data.....</b>	<b>22</b>
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>23</b>
<b>4.1 Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH (2,2 diphenyl-1-     picrylhydrazyl) .....</b>	<b>23</b>
<b>4.2 Uji Daya Reduksi Antioksidan Metode <i>Reducing Power</i>.....</b>	<b>25</b>
<b>4.3 Uji Protein Terlarut .....</b>	<b>27</b>
<b>4.4 Uji Daya Ikat Air .....</b>	<b>29</b>
<b>BAB 5. PENUTUP.....</b>	<b>31</b>
<b>5.1 Kesimpulan .....</b>	<b>31</b>
<b>5.2 Saran.....</b>	<b>31</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>32</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>38</b>

**DAFTAR GAMBAR**

Gambar 2. 1 Ikan bibisan ( <i>Apogon albimaculosus</i> ).....	4
Gambar 2. 2 Tanaman biduri ( <i>Calotropis gigantea</i> ).....	6
Gambar 2. 3 Tanaman pepaya ( <i>Carica papaya L.</i> ).....	8
Gambar 2. 4 Reaksi antara Radikal DPPH dengan Senyawa Antioksidan .....	13
Gambar 3. 1 Skema Pembuatan Enzim Biduri dan Papain.....	18
Gambar 3. 2 Diagram Alir Pembuatan Hidrolisat Protein Ikan .....	19
Gambar 4.1 Aktivitas Antioksidan Hidrolisat Protein Ikan Bibisan.....	24
Gambar 4. 2 Aktivitas Antioksidan Metode <i>Reducing Power</i> .....	26
Gambar 4. 3 Protein Terlarut .....	27
Gambar 4. 4 Daya Ikat Air.....	29



**DAFTAR TABEL**

Tabel 2. 1 Kandungan asam amino dalam ikan bibisan.....	5
Tabel 3. 1 Persentase kombinasi enzim biduri dan papain .....	17



## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan negara bahari dengan berbagai kekayaan laut yang terkandung di dalamnya. Potensi perikanan Indonesia diperkirakan mencapai 6,4 juta ton per tahun yang tersebar di perairan wilayah Indonesia dan Zona Ekonomi Eksklusif (Nurhayati *et al*, 2013). Ikan adalah salah satu hasil laut yang memiliki kandungan nutrisi yang baik dan merupakan sumber protein hewani yang tinggi. Protein yang terdapat dalam daging ikan sebesar 30-80%, sehingga ikan dapat dijadikan sebagai sumber protein hewani yang potensial (SNI, 2006). Konsumsi ikan dalam kehidupan sehari-hari sangat dianjurkan dalam menu makanan sehat. Selain dari segi nutrisinya, ikan laut juga mempunyai nilai ekonomi yang tinggi dengan daya produksi tinggi, ikan-ikan tersebut tidak hanya dikategorikan sebagai jenis ikan berkualitas baik dengan harga yang baik (seperti ikan kakap, tenggiri, tuna, kerapu dan lain-lain), akan tetapi juga terdapat jenis ikan dengan kualitas baik yang mempunyai nilai ekonomi rendah seperti ikan bibisan.

Menurut Astawan (2004), ikan bibisan merupakan ikan inferior yang memiliki kandungan asam amino essensial yang lengkap dan sangat diperlukan oleh tubuh manusia serta merupakan sumber antioksidan bagi tubuh. Pada saat musim panen jumlah ikan inferior ini sangat berlimpah sehingga tidak dapat ditangani secara optimal. Ikan segar mudah mengalami kerusakan setelah ditangkap yang akan diikuti oleh proses pembusukan sehingga dapat menyebabkan mutu ikan menjadi rendah. Berdasarkan hal tersebut perlu adanya perlakuan terhadap ikan agar dapat menambah nilai guna dan ekonomi serta memiliki umur simpan lebih lama. Salah satu pemanfaatan yang dapat dilakukan terhadap jenis ikan inferior yaitu sebagai protein fungsional dalam bentuk hidrolisat protein ikan.

Hidrolisat protein ikan merupakan produk yang dihasilkan dari penguraian protein ikan menjadi senyawa-senyawa berantai pendek karena adanya proses hidrolisis baik oleh enzim, asam maupun basa. Hidrolisat protein ikan dapat

diproduksi secara kimiawi dan enzimatis. Namun pada penelitian ini hidrolisat protein ikan diproduksi secara enzimatis menggunakan enzim protease.

Protease sejauh ini merupakan enzim yang paling penting peranannya dalam industri pangan diantara enzim lainnya. Namun ketersediaan enzim protease di dunia belum mencukupi kebutuhan, sementara kebutuhan enzim ini bagi industri pangan cenderung meningkat, oleh karena itu perlu dicari sumber-sumber enzim protease lain dari tanaman yang dapat mencukupi kebutuhan akan enzim tersebut. Enzim protease yang digunakan dalam pembuatan hidrolisat protein ikan diperoleh dari kombinasi getah tanaman biduri (enzim biduri) dan enzim papain. Menurut Witono (2002b), ekstrak dari tanaman biduri baik dari getah, daun, maupun batang memiliki potensi tinggi sebagai sumber penghasil enzim protease dan merupakan enzim eksopeptidase yang cocok untuk diaplikasikan pada pembuatan hidrolisat protein. Enzim papain termasuk enzim endopeptidase yang berfungsi untuk memecah protein secara acak di bagian tengah rantai molekul protein dan biasanya tidak mempengaruhi gugus yang terletak di ujung molekul (Witono *et al.*, 2004). Pada penelitian lain juga telah dilakukan ekstraksi enzim protease dari getah biduri serta purifikasi (pemurnian) enzim tersebut sehingga mudah digunakan (Witono *et al.*, 2007a).

Antioksidan adalah zat yang sangat berguna bagi tubuh karena antioksidan dapat melawan pengaruh bahaya dari radikal bebas dalam tubuh. Antioksidan dalam tubuh dibutuhkan untuk menunda atau menghambat reaksi oksidasi oleh radikal bebas atau menetralkan dan menghancurkan radikal bebas yang dapat menyebabkan kerusakan sel dan biomolekul seperti DNA, protein, dan lipoprotein di dalam tubuh yang akhirnya dapat memicu terjadinya penyakit degeneratif (Alfira, 2014). Jenis antioksidan terdiri dari dua, yaitu antioksidan alam dan antioksidan sintetik (Cahyadi, 2006). Antioksidan alami banyak terdapat pada tumbuh-tumbuhan, sayur-sayuran dan buah-buahan (Winarsi, 2007), sedangkan yang termasuk dalam antioksidan sintetik yaitu butil hidroksilanisol (BHA), butil hidroksitoluen (BHT), propilgallat, dan etoksiquin (Cahyadi, 2006).

Penelitian ini fokus menguji aktivitas antioksidan hasil hidrolisis protein ikan bibisan menggunakan kombinasi enzim biduri dan papain yang dikategorikan

masih belum pernah dilakukan. Penelitian ini dapat meningkatkan nilai guna dan nilai ekonomi serta pengetahuan masyarakat tentang ikan bibisan dan kombinasi enzim biduri dengan papain yang kurang begitu diketahui oleh masyarakat.

## **1.2 Rumusan Masalah**

Hidrolisat protein ikan dapat diperoleh melalui mekanisme enzimatik menggunakan enzim biduri yang berpola eksopeptidase dan enzim papain berpola endopeptidase. Enzim endopeptidase berfungsi untuk memecah protein di bagian tengah rantai protein, sedangkan eksopeptidase merupakan enzim yang memecah diujung. Hidrolisat protein ikan dengan kombinasi enzim biduri dan papain masih belum pernah dilakukan, sehingga perlu dilakukan penelitian mengenai hidrolisat protein ikan bibisan menggunakan enzim biduri dan papain, serta bagaimana aktivitas antioksidan dan sifat fungsional dari hidrolisat protein ikan bibisan yang dihasilkan dari proses hidrolisis tersebut.

## **1.3 Tujuan**

1. Mengetahui aktivitas antioksidan hasil hidrolisis protein ikan bibisan menggunakan kombinasi enzim biduri dan papain.
2. Mengetahui potensi ikan bibisan untuk protein fungsional yang baik.

## **1.4 Manfaat Penelitian**

1. Meningkatkan nilai guna ikan bibisan yang selama ini kurang dimanfaatkan untuk produk olahan.
2. Mendorong penggalian sumber-sumber antioksidan alami baru berbasis potensi lokal dari hasil perikanan laut.
3. Menambah pengetahuan penulis tentang pemanfaatan ikan sebagai protein fungsional dalam bentuk hidrolisat protein ikan.
4. Diharapkan dapat membuka peluang industri pengolahan ikan agar dapat menambah nilai ekonomi ikan.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Ikan Bibisan (*Apogon albimaculosus*)

Ikan Bibisan (*Apogon albimaculosus*) tergolong hewan karnivora. Badannya kecil dan gerakannya cepat. Beberapa jenis *apogonidae* berwarna terang dan mempunyai pola warna yang menarik berupa garis atau titik. Tubuhnya panjang, agak tinggi, dan pipih. Kepalanya besar dengan mulut yang menonjol. Sisiknya berukuran kecil sampai besar, sikloid pada kepala dan sikloid atau stenoid pada tubuh. Gurat sisinya sederhana dan kadang-kadang terputus. Ikan bibisan betina selalu membawa telur- telurnya. Ikan-ikan muda yang baru menetas akan dimasukkan oleh induk betina ke dalam mulutnya (Myers, 1997). Gambar ikan bibisan dapat dilihat pada Gambar 2.1.



Gambar 2. 1 Ikan bibisan (*Apogon albimaculosus*)

Klasifikasi ikan bibisan sebagai berikut:

Nama Indonesia	: Ikan bibisan
Nama Internasional	: <i>Cardinalfishes</i>
Nama Latin	: <i>Apogon albimaculosus</i>
Filum	: <i>Chordata</i>
Kelas	: <i>Osteichthyes</i>
Famili	: <i>Apogonidae</i>
Genus	: <i>Pterapogon</i>

Umumnya *apogonidae* hidup di sekitar pantai karang dan di antara rumput-rumput laut. Beberapa jenis *apogonidae* lebih suka hidup di perairan payau atau di perairan tawar yang berjarak beberapa mil dari laut. Mereka banyak tersebar di perairan Maluku, Flores, Lampung, Kepulauan Seribu, Bali dan Banyuwangi (Van der Maesen, 1993).

Protein yang terdapat dalam ikan bibisan sebesar 18,26% (Wahyuningtyas, 2017). Menurut Astawan (2004), ikan bibisan merupakan ikan inferior yang

memiliki kandungan asam amino essensial yang lengkap dan sangat diperlukan oleh tubuh manusia serta merupakan sumber antioksidan bagi tubuh. Kandungan asam amino dalam ikan bibisan dapat dilihat pada Tabel 2.1.

Tabel 2. 1 Kandungan asam amino dalam ikan bibisan

No.	Parameter	Prosentase Asam Amino
1	L-aspartic acid	1,915
2	L-serine	0,484
3	L-glutamic acid	3,150
4	Glycine	0,764
5	L-histidine	0,403
6	L-agrinine	1,208
7	L-threonine	0,722
8	L-alanine	1,053
9	L-proline	0,632
10	L-cystine	0,039
11	L-tyrosine	0,548
12	L-valine	1,035
13	L-Metheonine	0,649
14	L-lysineHCl	2,345
15	L-isoleucine	0,975
16	L-leucine	1,560
17	L-Phenylalanine	0,781
	Jumlah	18,268

Sumber: Witono (2014).

## 2.2 Enzim Protease

Protease adalah enzim pemecah ikatan peptida dalam peptida, polipeptida dan protein menjadi molekul-molekul yang lebih sederhana seperti peptida rantai pendek dan asam amino menggunakan reaksi hidrolisis. Enzim protease memiliki peran besar dalam proses-proses seluler karena kemampuan proteolitiknya yang esensial. Aplikasinya yang luas sebagai penghidrolisis protein membuat enzim protease memiliki nilai ekonomis tinggi (Akhdiya, 2003).

Enzim protease berfungsi mengkatalis hidrolisis ikatan peptida pada protein. Aplikasi protease di bidang industri pangan adalah pengempuk daging (Murtini dan Qomaruddin, 2003), hidrolisat protein (Subagio *et al.*, 2002), pembuatan keju dan sebagainya. Contoh industri pengguna enzim protease adalah deterjen, farmasi, makanan, kimia, pakan ternak, dan pelapis perak (Sawant dan Nagendran, 2014).

Enzim protease adalah salah satu jenis enzim yang diisolasi dari jaringan baik dari mikroorganisme, jaringan hewan, maupun tumbuhan yang mempunyai peran besar dalam berbagai industri. Kemampuan proteolisis dari enzim itu telah banyak diaplikasikan pada industri-industri pembuatan roti, produksi keju, penjernihan bir, pengempuk daging, dan sebagainya (Winarno, 1995).

Enzim protease dalam industri pengolahan makanan merupakan salah satu enzim terbesar penggunaannya selain amilase, glucoamilase dan glukosidase. Berdasarkan letak pemecahannya enzim protease dapat diklasifikasikan menjadi 2 macam yaitu enzim eksopeptidase dan endopeptidase. Enzim eksopeptidase memecah ikatan peptida secara acak dari salah satu ujung protein. Protease eksopeptidase ada 2 macam yaitu karboksi eksopeptidase dan amino eksopeptidase. Sedangkan enzim protease jenis endopeptidase merupakan enzim yang memecah ikatan peptida secara acak pada bagian tengah (dalam) rantai molekul protein dan menghasilkan unit-unit asam amino (Winarno, 1995).

### 2.2.1 Enzim Biduri

Tanaman biduri merupakan tanaman bergetah, seluruh tanaman biduri akan mengalir getah pada tempat yang dilukai atau dipotong. Cairan getah tanaman biduri dalam bidang kedokteran mempunyai kegunaan, seperti menstimulir pematangan bisul, untuk menanggalkan gigi geraham, bahkan di beberapa daerah telah digunakan untuk menyembuhkan luka. Getah dari sejenis tanaman biduri yakni *Calotropis procera* telah berhasil digunakan untuk pembuatan keju (Eskin, 2000). Gambar tanaman biduri dapat dilihat pada Gambar 2.2.



Gambar 2. 2 Tanaman biduri (*Calotropis gigantea*)

Menurut Dalimartha (2003), taksonomi tanaman biduri (*Calotropis gigantea*) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: <i>Plantae</i>
Subkingdom	: <i>Tracheobionita</i>
Super Divisi	: <i>Spermatophyta</i>
Divisi	: <i>Magnoliophyta</i>
Kelas	: <i>Magnoliopsida</i>
Sub Kelas	: <i>Asteridae</i>
Ordo	: <i>Gentianales</i>
Famili	: <i>Asclepiadaceae</i>
Genus	: <i>Calotropis</i>
Spesies	: <i>Calotropis gigantea</i>

Winarno (1997) menyatakan bahwa enzim protease dari getah biduri berdasarkan letak pemecahannya dapat diklasifikasikan menjadi 2 macam yaitu enzim eksopeptidase dan endopeptidase. Enzim eksopeptidase memecah ikatan peptida secara acak dari salah satu ujung protein. Protease eksopeptidase ada 2 macam yaitu karboksi eksopeptidase dan amino eksopidase. Sedangkan enzim protease jenis endopeptidase merupakan enzim yang memecah ikatan peptida secara acak pada bagian tengah (dalam) rantai molekul protein dan menghasilkan unit-unit asam amino.

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. Enzim yang termasuk golongan protease ini ialah protease dari tanaman misalnya papain, fisin, bromelin dan dari mikroba.

Susanti (2005) dan Witono, *et al.* (2007a) melaporkan bahwa enzim protease biduri memiliki karakteristik sebagai berikut:

- Suhu optimum enzim protease dari getah biduri yaitu 55°C.
- Aktivitas optimal pada pH optimum enzim protease 7.
- Enzim protease dari getah biduri dapat diinaktivasi pada suhu di atas 60°C dan protein enzim terdenaturasi dengan cepat pada suhu 90°C.



### 2.2.2 Enzim Papain

Pepaya adalah tumbuhan penghasil enzim papain yang merupakan golongan enzim protease sulfhidril (Dongoran, 2004). Papain adalah enzim yang tergolong dalam protease sistein yang ditemukan dalam getah pepaya. Papain dikatakan sebagai enzim proteolitik dengan spektrum luas karena memiliki aktivitas endopeptidase, amidase, dan esterase. Enzim ini memiliki manfaat dan peran dalam berbagai bidang. Enzim papain dalam industri makanan digunakan sebagai pengempuk daging dan konsentrat protein, dalam industri pembuatan keju papain berfungsi sebagai penggumpal susu, dalam detergen papain berfungsi menghilangkan sisa-sisa serat pada kain, dan dalam industri farmasi dan kosmetika papain digunakan untuk menurunkan viskositas bahan, berperan sebagai bahan aktif dalam pembuatan krim pembersih kulit, mencegah deformasi luka pada kornea mata dan pembersih lensa mata (Leipner and Salller, 2000).

Enzim papain termasuk enzim endopeptidase yang berfungsi untuk memecah protein secara acak di bagian tengah rantai molekul protein dan biasanya tidak mempengaruhi gugus yang terletak diujung molekul. Selain itu enzim papain mempunyai beberapa kelebihan antara lain mudah didapat, tersedia dalam jumlah banyak, tahan terhadap kondisi asam dan basa, suhu tinggi serta harganya murah (Witono *et al.*, 2004). Gambar tanaman pepaya dapat dilihat pada Gambar 2.3.



Gambar 2. 3 Tanaman pepaya (*Carica papaya L.*)

Menurut Tjitrosoepomo (1996), taksonomi pepaya adalah sebagai berikut:

Kingdom	: <i>Plantae</i>
Divisio	: <i>Spermatophyta</i>
Classis	: <i>Dicotyledonae</i>
Ordo	: <i>Violales</i>
Familia	: <i>Caricaceae</i>
Genus	: <i>Carica</i>
Spesies	: <i>Carica papaya L.</i>

### 2.3 Hidrolisis Protein

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 (Hazlaniza, 2010).

Hidrolisis protein dipengaruhi oleh konsentrasi bahan-bahan penghidrolisis, suhu, dan waktu hidrolisis serta tekanan udara. Peningkatan konsentrasi enzim ternyata akan meningkatkan volume hidrolisat protein ikan yang bersifat tidak larut menjadi senyawa nitrogen yang bersifat larut. Kecepatan katalisis enzim meningkat pada konsentrasi enzim yang lebih besar, tetapi bila konsentrasi enzim berlebih, maka proses tersebut tidak efisien. Berdasarkan hal tersebut untuk meningkatkan aktivitas hidrolisis, maka dapat digunakan enzim-enzim proteolitik komersial (Syahrizal, 1991). Hidrolisis secara enzimatik lebih efisien, murah, menghasilkan hidrolisat protein ikan tanpa kehilangan asam amino esensial, serta terhindar dari perubahan atau kerusakan produk yang bersifat non hidrolitik, karena pada proses hidrolisis dengan asam maupun basa dapat merusak sebagian asam amino dan juga menghasilkan senyawa beracun (Ariyani *et al.*, 2003).

Pada mekanisme pengikatan enzim terhadap substrat, proses hidrolisis tersusun atas dua tahap reaksi. Reaksi pertama adalah reaksi asilasi untuk membentuk ikatan kompleks enzim substrat, sedangkan reaksi kedua adalah reaksi deasilasi yang ditandai dengan hidrolisis ikatan kompleks enzim substrat menjadi produk dan enzim (Wong, 1989).

Ikatan peptida yang membangun rantai polipeptida dalam protein dapat diputus (dihidrolisis) menggunakan asam, basa atau enzim pemecahan ikatan peptida dalam kondisi asam atau basa kuat merupakan proses hidrolisis kimia dan pemecahan ikatan peptida menggunakan enzim merupakan proses hidrolisis biokimia reaksi hidrolisis peptida akan menghasilkan produk reaksi yang berupa satu molekul dengan gugus karboksil dan molekul lainnya memiliki gugus amina (Junianto *et al.*, 2006).

#### **2.4 Hidrolisat Protein**

Hidrolisat protein merupakan produk yang dihasilkan dari peruraian protein menjadi senyawa-senyawa berantai pendek karena adanya proses hidrolisis baik oleh enzim, asam maupun basa (Pigot and Tucker, 1990). Hidrolisat protein bisa di peroleh dari bahan pangan yang mengandung protein seperti kacang-kacangan, daging maupun ikan. Pengolahan ikan menjadi hidrolisat protein bertujuan untuk mendapatkan bahan pangan yang lebih mudah dicerna oleh tubuh karena proteinnya telah terurai menjadi asam amino dan peptida yang lebih sederhana. Pada umumnya pemanfaatan hidrolisat protein ikan adalah untuk pembuatan pepton yang digunakan sebagai media pertumbuhan mikroorganisme dalam perkembangan bioteknologi (Wijayanti, 2009).

Hidrolisat protein ikan 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 and Ahmad, 1992). Selain itu hidrolisat protein ikan juga memiliki aktivitas antioksidan yang bermanfaat untuk mencegah ketengikan pada makanan (Venugopal, 2006). Hidrolisat protein ikan memiliki indikasi untuk menurunkan tekanan darah tinggi, mengurangi stress serta membantu penyembuhan pasien yang menderita gangguan pada sistem pencernaan (Kristinsson *et al.*, 2007).

Keuntungan menggunakan hidrolisat protein untuk berbagai pengolahan pangan adalah bahwa hidrolisat protein umumnya mudah larut, stabil pada

pemanasan tinggi, tidak mudah mengendap oleh adanya berbagai agensia atau keadaan seperti misalnya adanya ion-ion logam. Beberapa faktor yang berpengaruh terhadap kecepatan dan kekhasan pada pembuatan hidrolisat protein yaitu suhu, lama hidrolisis dan konsentrasi enzim yang ditambahkan. Sedangkan tingkat kerusakan asam amino dipengaruhi oleh kemurnian protein dari bahan dasar, kondisi dan bahan penghidrolisis yang digunakan. Produk akhir hidrolisat protein ini dapat berupa cair, pasta atau bubuk yang bersifat higroskopis (Uhlig, 2001).

## 2.5 Antioksidan

Antioksidan adalah zat yang sangat berguna bagi tubuh karena antioksidan dapat melawan pengaruh bahaya dari radikal bebas di dalam tubuh yang terbentuk pada saat proses metabolisme oksidatif, yaitu hasil dari reaksi-reaksi kimia dan proses metabolik yang terjadi di dalam tubuh. Antioksidan menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas dan menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas yang dapat menimbulkan stress oksidatif. Senyawa kimia dan reaksi yang dapat menghasilkan spesies oksigen yang potensial bersifat toksik dapat dinamakan pro-oksidan. Sebaliknya, senyawa dan reaksi yang mengeluarkan spesies oksigen tersebut, menekan pembentukannya atau melawan kerjanya disebut antioksidan. Antioksidan alami di dalam makanan dapat berasal dari senyawa antioksidan yang sudah ada dari satu atau dua komponen makanan, senyawa antioksidan yang terbentuk dari reaksi-reaksi selama proses pengolahan, dan senyawa antioksidan yang diisolasi dari sumber alami dan ditambahkan ke makanan sebagai bahan tambahan pangan (Rohmatussolihat, 2009).

Antioksidan adalah senyawa pemberi elektron atau reduktan. Senyawa ini memiliki berat molekul kecil, tetapi mampu menginaktivasi berkembangnya radikal bebas melalui reaksi oksidasi. Antioksidan bekerja dengan cara mendonorkan satu elektronnya kepada senyawa yang bersifat oksigen sehingga aktivitas senyawa oksidan tersebut dapat dihambat (Winarsi, 2007). Antioksidan dibutuhkan untuk menunda atau menghambat reaksi oksidasi oleh radikal bebas

atau menetralkan dan menghancurkan radikal bebas yang dapat menyebabkan kerusakan sel dan biomolekul seperti DNA, protein, dan lipoprotein di dalam tubuh yang akhirnya dapat memicu terjadinya penyakit dan penyakit degeneratif (Alfira, 2014).

Berdasarkan mekanisme kerjanya antioksidan dibagi menjadi 3 golongan yaitu antioksidan primer, antioksidan sekunder, dan antioksidan tersier. Antioksidan primer disebut juga sebagai antioksidan enzimatis, antioksidan primer meliputi enzim superoksida dismutase, katalase dan glutathion peroksidase. Enzim-enzim ini bekerja dengan cara menghambat pembentukan radikal bebas dengan cara memutus reaksi berantai (polimerisasi), dan mengubahnya menjadi produk yang lebih stabil. Antioksidan sekunder disebut juga antioksidan eksogenus atau non enzimatis. Cara kerja non enzimatis yaitu dengan cara memotong reaksi oksidasi berantai dari radikal bebas, sehingga radikal bebas tidak bereaksi dengan komponen seluler. Contoh antioksidan sekunder yaitu vitamin E, vitamin C, flavonoid. Antioksidan tersier contohnya enzim DNA-repair dan mentionin sulfoksida reduktase yang berperan dalam perbaikan biomolekul yang dirusak oleh radikal bebas (Winarsi, 2007).

Senyawa antioksidan dapat ditemukan pada bahan pangan hewani daging atau hidrolisat protein dari bahan hewani tertentu yang mengandung senyawa bioaktif peptida. Hidrolisat protein ikan telah terbukti memiliki aktivitas antioksidan. Aktivitas antioksidan dari hidrolisat protein tergantung pada jenis peptida dalam hidrolisat (Je *et al.*, 2008).

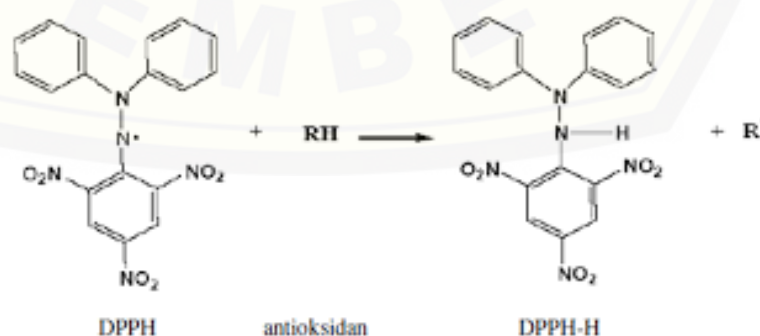
Peptida bioaktif adalah suatu jenis peptida yang memiliki urutan komposisi asam amino yang pasti, merupakan fragmen pecahan protein, dengan protein aslinya sendiri tidak memiliki keaktifan biologi. Senyawa peptida menunjukkan sifat-sifat spesifik, segera setelah lepas dari atau dilepaskan dari molekul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

## 2.6 Penentuan Aktivitas Antioksidan

Penentuan Aktivitas Antioksidan dalam bahan pangan dapat diukur dengan beberapa metode. Metode penentuan aktivitas antioksidan yang paling umum digunakan adalah metode DPPH dan *Reducing Power*.

### 2.6.1 Metode DPPH

Metode yang paling sering digunakan untuk menguji aktivitas antioksidan adalah metode uji dengan menggunakan radikal bebas DPPH. DPPH merupakan radikal bebas yang dapat bereaksi dengan senyawa yang dapat mendonorkan atom hidrogen, dapat berguna untuk pengujian aktivitas antioksidan komponen tertentu dalam suatu ekstrak. Hal ini dikarenakan adanya elektron yang tidak berpasangan, DPPH memberikan serapan kuat pada 517 nm. Ketika elektronnya menjadi berpasangan oleh keberadaan penangkap radikal bebas, maka absorbansinya menurun secara stokiometri sesuai jumlah elektron yang diambil. Keberadaan senyawa antioksidan dapat mengubah warna larutan DPPH dari ungu menjadi kuning (Dehpour *et al.*, 2009). Perubahan absorbansi akibat reaksi ini telah digunakan secara luas untuk menguji kemampuan beberapa molekul sebagai penangkap radikal bebas. Metode DPPH merupakan metode yang mudah, cepat, dan sensitif untuk pengujian aktivitas antioksidan senyawa tertentu atau ekstrak tanaman (Koleva *et al.*, 2002). Namun, pada metode ini terdapat kelemahan, kelemahan metode DPPH ini adalah hanya dapat memberikan informasi mengenai aktivitas senyawa yang diuji dan hanya dapat mengukur senyawa antiradikal yang terlarut dalam pelarut organik khususnya alkohol.



**Gambar 2. 4** Reaksi antara Radikal DPPH dengan Senyawa Antioksidan

### 2.6.2 Metode *Reducing Power*

Metode *Reducing power* merupakan metode yang digunakan untuk mengukur kekuatan reduksi suatu sampel. Metode ini dilakukan berdasarkan kemampuan suatu senyawa dalam mereduksi  $Fe^{3+}$  menjadi  $Fe^{2+}$ . Antioksidan dalam sampel akan mereduksi  $Fe^{3+}$  menjadi  $Fe^{2+}$  dengan memberikan sebuah elektron. Jumlah kompleks  $Fe^{2+}$  dapat diketahui dengan mengukur formasi *Perl's Prussian blue* pada panjang gelombang 700 nm. Meningkatnya absorban pada 700 nm menjadi indikasi meningkatnya kemampuan mereduksi dari antioksidan (Ebrahimzadeh et al., 2008). Reaksi yang terjadi adalah sebagai berikut:



### 2.7 Faktor-Faktor Yang Mempengaruhi Proses Hidrolisis Protein

Faktor-faktor yang mempengaruhi proses hidrolisis protein yaitu lama hidrolisis, suhu, konsentrasi enzim, konsentrasi substrat dan pH.

#### 1. Lama Hidrolisis

Waktu hidrolisis yang berlebih akan menyebabkan jumlah peptida dan asam amino menurun serta jumlah padatan tidak fungsional akan meningkat. Lama hidrolisis mempengaruhi kadar nitrogen dan derajat hidrolisis (Haslaniza, 2010).

#### 2. Suhu

Menurut Arteaga dan Nakai (1990), pada suhu tinggi atau melewati suhu optimum akan menyebabkan kerusakan protein enzim yang disebut denaturasi sehingga terjadi penurunan aktivitas dan kecepatan reaksi enzimatik. Reaksi enzimatik berlangsung lambat ketika suhu rendah. Ketika suhu ditingkatkan hingga suhu optimum, reaksi enzimatik berjalan cepat dan mencapai maksimum.

#### 3. Konsentrasi Enzim

Kecepatan reaksi enzimatik berbanding lurus dengan konsentrasi enzim. Semakin tinggi konsentrasi enzim maka reaksi enzimatik semakin cepat hingga mencapai kecepatan yang tetap. Peningkatan konsentrasi

enzim menyebabkan peningkatan kadar nitrogen dan derajat hidrolisis (Haslaniza, 2010).

#### 4. Konsentrasi Substrat

Enzim bekerja secara spesifik. Enzim akan berikatan dengan substrat yang cocok membentuk ikatan antara enzim-substrat (E-S). Enzim-substrat ini akan dipecah menjadi hasil reaksi atau biasa disebut produk dan enzim bebas. Selain jenis substrat, konsentrasi substrat juga menentukan jumlah produk yang dihasilkan. Penambahan substrat sampai jumlah tertentu dengan jumlah enzim yang ditetapkan mempercepat reaksi enzimatik hingga mencapai maksimum, selanjutnya penambahan substrat tidak akan menambah kecepatan reaksi (Koesoemawardani et al., 2011).

#### 5. pH

Faktor lain yang juga berpengaruh terhadap aktivitas enzim adalah pH. Apabila pH semakin jauh dari pH optimum enzim, maka aktivitas enzim semakin rendah karena enzim tidak stabil. Hal ini disebabkan enzim termasuk protein yang tersusun atas asam amino. pH berhubungan dengan sifat asam basa protein (Witono et al., 2007a).



### BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN

#### 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan di Laboratorium Kimia dan Biokimia Hasil Pertanian, Laboratorium Analisa Terpadu Fakultas Teknologi Pertanian, Laboratorium Biofarmedik Fakultas Farmasi dan Laboratorium *Center for Development of Advanced Science and Technology* (CDAST) Universitas Jember pada bulan Maret hingga Juli 2019.

#### 3.2 Bahan dan Alat Penelitian

##### 3.2.1 Bahan Penelitian

Bahan baku yang digunakan dalam penelitian adalah Ikan Bibisan (*Apogon albimaculosus*) yang diperoleh dari perairan air laut di Pulau Talango, Madura. Bahan baku lainnya adalah enzim papain hasil ekstraksi dari getah tanaman pepaya yang diperoleh dari kecamatan Sumpalsari, Jember dan enzim biduri hasil ekstraksi dari getah tanaman biduri yang diperoleh di pesisir Puger, Jember. Ikan dan kedua enzim tersebut disimpan dalam *ice box* selama perjalanan dan *freezer* selama waktu penyimpanan.

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian antara lain; aquades, DPPH 0,1 mM, asam askorbat, kasein, tirosin, etanol p.a., etanol 97%, BHT (*Butylated Hydroxytoluene*), buffer fosfat pH 7 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  dan  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), potasium ferricyanide [ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ] 1%, TCA (asam trikloroasetat) 10%,  $\text{FeCl}_3$  0,1%,  $\text{HCl}$  0,02 N,  $\text{NaOH}$  1 N,  $\text{HCl}$  6 N, kertas *milipore* no. 45,  $\text{CuSO}_4$  1%, *Nak-Tartrat* 1%, *follin*,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2%, *BSA* (*Bovine Serum Albumin*).

##### 3.2.2 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian antara lain; sentrifuse dan tabungnya (Yenaco model YC-1180), *waterbath* (GFL 1083), pH meter (Jen Way tipe 3320), vortex (Thermolyne type 16700), neraca analitik Ohaus, blender stainless steel (Philips), spektrofotometer dan kuvetnya (Shimadzu), lemari pendingin, heater listrik (Maspion), dan peralatan gelas kaca (Pyrex dan Duran).

### 3.3 Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan dua tahap. Penelitian tahap I adalah analisis aktivitas antioksidan untuk mengetahui sampel dengan aktivitas antioksidan tertinggi pada setiap jenis sampel. Penelitian tahap II adalah pengujian sifat fungsional yang dilakukan terhadap sampel. Data yang diperoleh pada penelitian tahap II diolah secara deskriptif, kemudian hasilnya disajikan dalam bentuk grafik.

Penelitian ini dilakukan sebanyak tiga kali ulangan menggunakan ikan bibisan yang dihidrolisis dengan kombinasi protease biduri dan papain. Presentase kombinasi enzim biduri dan papain dapat dilihat pada Tabel 3.1.

Tabel 3. 1 Persentase kombinasi enzim biduri dan papain

Jenis Ikan	Kosentrasi enzim (biduri : papain)
Ikan Bibisan	10% B : 90% P
	20% B : 80% P
	30% B : 70% P
	40% B : 60% P
	50% B : 50% P
	60% B : 40% P
	70% B : 30% P
	80% B : 20% P
	90% B : 10% P

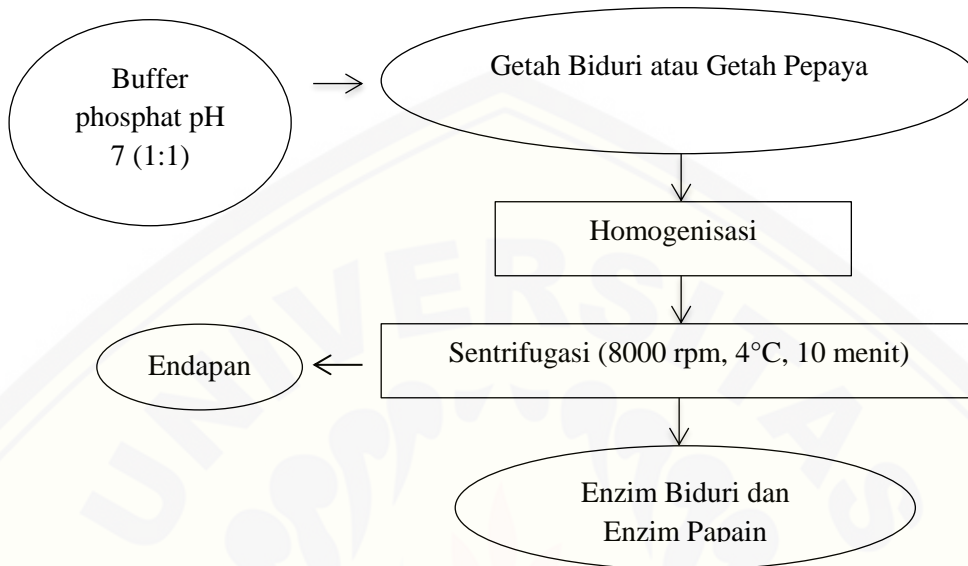
Keterangan: % (v/b) dalam total 3% dari protein ikan bibisan sebelum penghancuran

### 3.4 Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dalam tiga tahap, yaitu penelitian tahap I (pendahuluan) adalah pembuatan enzim biduri dan papain, serta pengujian aktivitas enzim biduri dan papain. Penelitian tahap II adalah pengujian analisis aktivitas antioksidan dengan metode DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) dan analisis daya reduksi antioksidan metode *Reducing Power*. Penelitian tahap III adalah pengujian sifat fungsional pada perlakuan sampel dengan aktivitas antioksidan tertinggi pada setiap jenis sampel dari penelitian tahap II menggunakan metode deskriptif.

### 3.4.1 Penelitian Tahap I (Pendahuluan)

Proses pembuatan enzim biduri dan papain dapat dilihat pada Gambar 3.1 berikut:

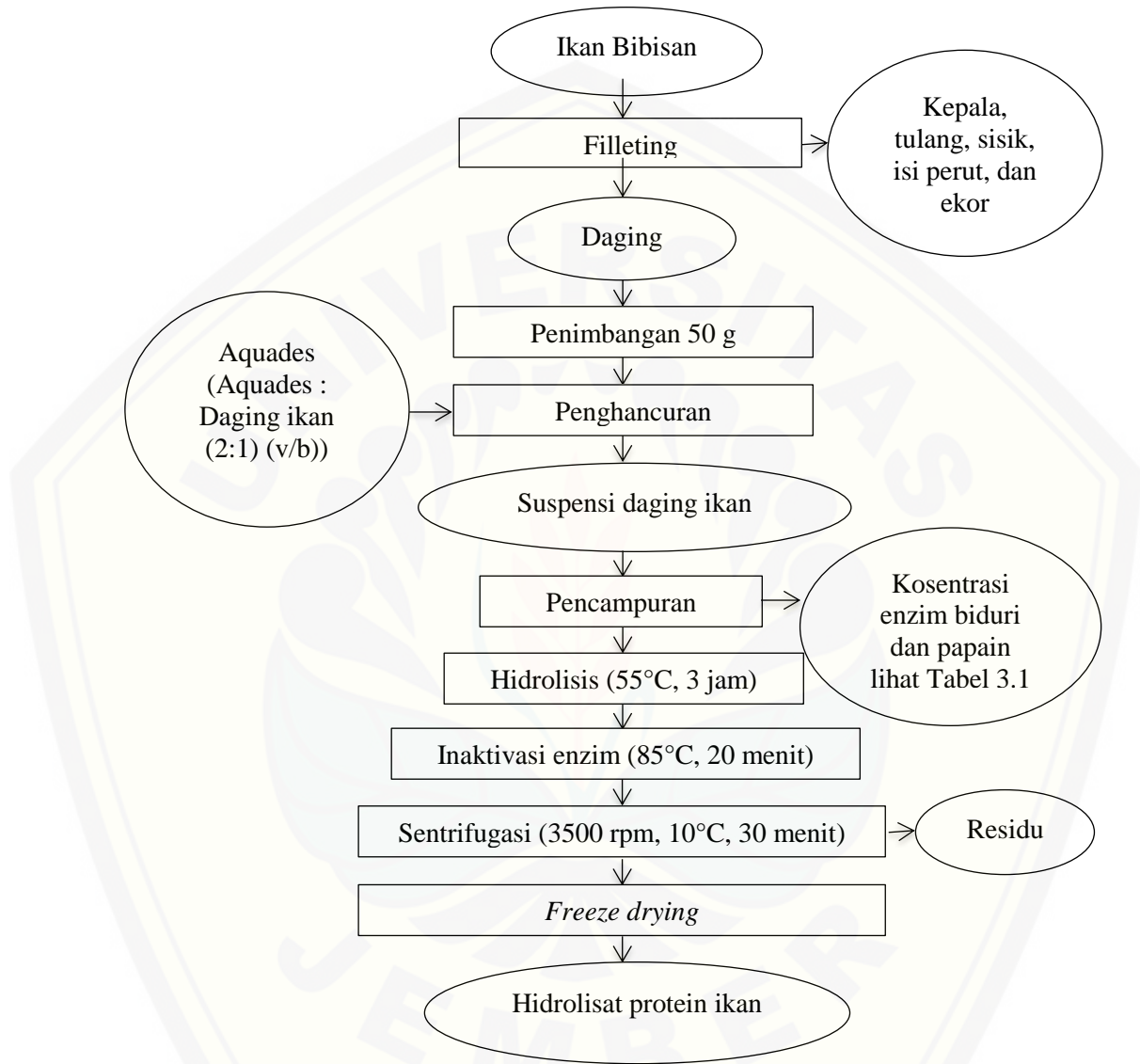


Gambar 3. 1 Skema Pembuatan Enzim Biduri dan Papain

Pengambilan getah dari tanaman biduri dan pepaya kemudian ditambahkan buffer phosphat pH 7 dengan perbandingan 1 : 1. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi dingin suhu 4°C pada kecepatan 8000 rpm selama 10 menit yang bertujuan untuk memisahkan supernatan dan endapan. Supernatan yang diperoleh merupakan ekstrak kasar (*crude*) enzim protease yang digunakan untuk menghidrolisis protein ikan bibisan.

### 3.4.2 Penelitian Tahap II

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



Gambar 3. 2 Diagram Alir Pembuatan Hidrolisat Protein Ikan

Pembuatan hidrolisat protein ikan dilakukan *filleting* pada ikan bibisan yang masih dalam keadaan segar dengan menghilangkan sisik, kepala, tulang, isi perut dan ekor, sehingga diperoleh daging ikan. Daging ikan yang telah di *fillet* ditambahkan aquades dengan perbandingan aquades dan daging ikan adalah 2 : 1 kemudian dilakukan penimbangan sebanyak 50 g. Selanjutnya daging yang telah

ditimbang dihancurkan dengan menggunakan *blender* menghasilkan suspensi ikan. Lalu suspensi tersebut dicampur dengan enzim biduri dan papain seperti pada Tabel 3.1. Kemudian dilakukan hidrolisis pada suhu 55°C selama 3 jam dan dilanjutkan inaktivasi enzim pada suhu 85°C selama 20 menit yang bertujuan untuk menghentikan proses hidrolisis. Sentrifugasi pada kecepatan 3500 rpm pada suhu 10°C selama 30 menit hingga menghasilkan supernatan dan residu. Perlakuan akhir yaitu *freeze drying*.

### 3.5 Variabel Pengamatan

Variabel yang diamati dalam penelitian ini meliputi :

#### A. Penelitian tahap I

1. Uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH (*2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl*) (Shimada et al., 1992)
2. Uji daya reduksi antioksidan metode *Reducing Power* (Oyaizu, 1986)

#### B. Penelitian tahap II

Uji Sifat Fungsional

- Protein terlarut *Metode Lowry* (Purwanto, 2014)
- Daya ikat air (*Water Holding Capacity/WHC*) (Touunkara, 2013)

### 3.6 Prosedur Analisis

#### 3.6.1 Uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH (*2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl*)

Metode ini dilakukan dengan melakukan pengenceran hidrolisat kering protein ikan dalam pelarut etanol p.a yang bertujuan untuk menentukan aktivitas antioksidan tertinggi. Sebanyak 1,5 ml larutan sampel hidrolisat protein ikan yang telah diencerkan direaksikan dengan 0,1 mM larutan DPPH dalam tabung reaksi. Selanjutnya homogenisasi menggunakan vortex selama 1 menit untuk menghentikan reaksi. Sampel diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit.

Pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 517 nm dilakukan untuk mengetahui persen inhibisi terhadap radikal bebas berupa DPPH.

$$\text{Uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH} = \frac{(A_0 - A_s)}{A_0} \times 100\%$$

Keterangan :

A<sub>0</sub> = Absorbans blanko

A<sub>s</sub> = Absorbans sampel

### 3.6.2 Uji daya reduksi antioksidan metode *Reducing Power* (Oyaizu, 1986)

Penentuan *reducing power* hidrolisat kering protein ikan menggunakan metode dari Oyaizu (1986). Hidrolisat kering protein ikan dilakukan pengenceran 2000 ppm. Sampel diambil sebanyak 2 ml ditambahkan buffer pottasium fosfat 0,2 M pH 6,6 sebanyak 2 ml dan 2 ml K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 1%. Kemudian inkubasi selama 20 menit pada suhu 50°C. Lalu ditambahkan 2 ml asam trikloroasetat (TCA) 10% dan dilakukan homogenisasi menggunakan vortex untuk menghentikan reaksi. Pendiaman pada sampel selama 10 menit untuk memisahkan supernatan endapan. Supernatan yang diperoleh diambil 2 ml lalu ditambahkan 2 ml aquades dan 0,4 ml FeCl<sub>3</sub> 0,1%. Campuran larutan tersebut didiamkan selama 30 menit sebelum dilakukan absorbansi dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 700 nm untuk menyatakan *reducing power* pada sampel hidrolisat kering proten ikan. Blanko menggunakan aquades sebagai pengganti sampel. Asam askorbat digunakan sebagai kurva standar dengan konsentrasi 2, 4, 6, 8, dan 10 ppm. Peningkatan nilai absorbansi menunjukkan terjadi penurunan daya (*reducing power*) dari radikal bebas berupa K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> (*potsium ferricyanide*).

### 3.6.3 Uji Sifat Fungsional

#### a. Uji protein terlarut

Analisa protein metode *Lowry* digunakan untuk mengukur kadar protein terlarut pada ekstrak protein dan protein hasil hidrolisis enzimatis. Sebanyak 250 µl sampel atau standar yang terlarut dalam larutan NaOH 1 N dilakukan penambahan reagen *Lowry* sebanyak 2 ml yang terdiri dari campuran 50 ml larutan (2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 0,1 N NaOH) + 1 ml larutan (1% CuSO<sub>4</sub> + 1% sodium potassium tartrat) dalam air. Kemudian dibiarkan selama 10 menit. Selanjutnya

larutan ditambahkan 250 µl larutan reagen Folin Cialcalteau (1:1) dalam aquades dan dilakukan homogenisasi menggunakan vortex. Campuran yang telah divortex didiamkan pada suhu ruang selama 20 menit. Selanjutnya dilakukan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 550 nm. Pengukuran jumlah protein dilakukan dengan cara memasukkan data absorbansi yang diperoleh ke dalam persamaan matematik dari kurva standar protein, sehingga diperoleh kadar protein terlarut yang terkandung dalam larutan (Purwanto, 2014).

b. Uji daya ikat air (*Water Holding Capacity/WHC*)

Daging ayam sebanyak 5 g dihancurkan kemudian ditambahkan 1,5 ml aquades. Selanjutnya dicampurkan hidrolisat protein 1% dari berat daging ayam. Lalu dimasukkan dalam freezer selama 30 menit yang bertujuan untuk mengoptimalkan penyerapan hidrolisat protein dalam daging dan dilanjutkan dengan inkubasi pada suhu 95°C selama 10 menit. Kemudian daging ayam dilakukan pencucian dengan mengalirkan air kran pada daging ayam, lalu diusap dengan kertas saring agar air tidak ikut masuk saat penimbangan berat akhir. Selanjutnya dilakukan penimbangan berat akhir dan perhitungan WHC dengan rumus:

$$\text{Penurunan berat daging} = \frac{(\text{berat akhir} - \text{berat awal})}{(\text{berat blanko})} \times 100\%$$

$$\text{WHC} = 100 - \text{penurunan berat daging}$$

### 3.7 Analisa Data

Data yang diperoleh pada penelitian tahap I diolah menggunakan Metode Deskriptif untuk mendapatkan sampel dengan aktivitas antioksidan tertinggi. Hasil yang diperoleh pada penelitian tahap I disajikan dalam bentuk tabel dan diolah secara deskriptif. Data yang diperoleh pada penelitian tahap II diolah secara deskriptif, kemudian hasilnya disajikan dalam bentuk tabel.

## BAB 5. PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah:

1. Pengujian aktivitas antioksidan yang dilakukan dengan metode DPPH memiliki hasil aktivitas antioksidan tertinggi pada sampel 80%B : 20%P.
2. Pengujian aktivitas antioksidan yang dilakukan dengan metode Reducing Power memiliki nilai penghambat radikal bebas tertinggi pada sampel 80%B : 20%P.
3. Hidrolisat protein ikan bibisan memiliki nilai protein terlarut tertinggi pada sampel 20% enzim biduri : 80% enzim papain yaitu sebesar 1,329%.
4. Daya ikat air tanpa penambahan hidrolisat protein ikan memiliki nilai terendah dibanding dengan penambahan hidrolisat protein ikan. Semakin rendah daya ikat maka semakin besar susut masak dan komponen yang terdapat dalam daging menurun sehingga kualitas daging rendah.

### 5.2 Saran

Pada penelitian selanjutnya sebaiknya lebih teliti dalam penggunaan bahan kimia yang digunakan, pastikan bahan kimia yang digunakan tidak rusak sehingga dapat meningkatkan efisien waktu yang digunakan.



## DAFTAR PUSTAKA

- Ahmed, H. 2005. *Principles and Reactions of Protein Extraction, Purification, and Characterization*, CRC Press, Florida, pp. 35-42.
- Akhdiya, A. 2003. Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Protease Alkalin Termotabil. *Buletin Plasma Nutfah*. Vol. 9 (2): 38-44.
- Alfira, N. 2014. *Uji Aktifitas Antioksidan Ekstrak dan Fraksi Aktif Kulit Batang Sintok (Cinnamomum sintoc)*. Jakarta: UIN Syarif Hidayatullah
- Ariyani, F., Saleh, M., Tazwir dan Hak, N. 2003. Optimasi Proses Produksi Hirdolisat Protein Ikan dari Mujahir (*Oreochromis mossambicus*). *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia*. Vol. (9): 11-21.
- Arteaga, G. E., dan Nakai, S. 1990. Tetrathionate Protects Proteolytic Activity of Simulated Papaya Latex and Crude Papain. *Jurnal Food Science*. Vol. 55 (6): 1728-1734.
- Astawan. 2004. *Teknologi Pengolahan Pangan Hewani Tepat Guna*. Jakarta: Akademi Pressindo.
- Belitz, H. D., Grosch, W., Schieberle, P. 2009. *Food Chemistry*. Germany: Springer-Verlag.
- Bouton, P. E., P. V. Harris., and W. R. Shorthose. 1972. *The Effects of Cooking Temperature and Time on Some Mechanical Properties of Meat*. *J. Food Sci.* 97: 140-144.
- Buckle, K. A., Edwards, R. A., Fleet, G. H., and Wotton, M. 1987. *Ilmu Pangan*. Penerjemah Hari Purnomo dan Adiono. Jakarta: Universitas Indonesia Press.
- Cahyadi, W. 2006. *Bahan Tambahan Pangan*. Jakarta: Bumi Aksara.
- Cheung, C.M.K and M.K.L. Lee. 2012. What drives consumers to spread electronic word of mouth in online consumer opinion platform. *Decision Support System* 53, pp. 218-225
- Cumby, N., Zhong, Y., Naczki, M. & Shahidi, F. 2008. Antioxidant activity and water-holding capacity of canola protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 109, 144-148.

- Dalimartha, S. 2003. *Biduri (Calotropis gigantea [Wild.] Dryand. ex W.T.Ait.)*. Jakarta: Pdpersi.
- Deddy, M. dan Nurheni. 1992. *Metoda Kimia Biokimia dan Biologi dalam Evaluasi Nilai Gizi Pangan Olahan*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi Institut Pertanian Bogor, Bogor. 119.
- Dehpour, A.A., Ebrahimzadeh, M.A., Fazel, N.S., dan Mohammad N.S. 2009. Antioxidant activity of methanol extract of ferula assafoetida and its essential oil composition. *Grasas Aceites*. 60: (4). 405-412.
- Dongoran, D.S. 2004. Pengaruh Aktivator Sistein Dan Natrium Klorida Terhadap Aktivitas Papain. *Jurnal Sains Kimia*. Vol.8 (1): 26-28.
- Dwiloka, B. dan U. Atmomarsono. 2007. *Kandungan Logam Berat pada Daging Dada dan Paha Ayam Broiler yang Dipelihara dengan Sistem Kandang Panggung Setelah Direbus dan Dikukus*. Staf Dosen pada Laboratorium Teknologi Hasil Ternak, Fakultas Peternakan, UNDIP. 235-242.
- Ebrahimzadeh, M.A., Pourmorad F, Bekhradnia AR. 2008. Iron Chelating Activity, Phenol and Flavonoid Content of Some Medicinal Plants From Iran. *Afr. J. Biotechnol.* 7 (18): 3188-3192
- Eskin, M. 2000. *Food Shelf Life Stability*. USA: CRC Press.
- Fogle, D.R., Plimton, R.F., Ockerman, H.W., Jarenback, L., dan Persson, T. 1982. Tenderization of Beef. Effect of Enzyme, Level Enzyme and Cooking Method. *Journal of Food Science*. Vol. 47: 1113-1117.
- Gbogouri, G. A., Linder M., Fanni, J., Parmen tier, M. 2004. Influence of hydrolysis degree on the functional properties of salmon by product hydrolysates. *Journal of Food Science* 69: C615–C622. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2004.tb09909.x.
- Hall, G.M and Ahmad, N.H. 1992. *Surimi and Fish Mince Product*. In: Fish Processing Tecnology. Editor: G.M. hall. Blackie Academic & Professional. New York.
- Haslaniza, H. 2010. The effects of enzyme concentration, temperature and incubation time on nitrogen content and degree of hydrolysis of protein precipitate from cockle (*Anadara granosa*) meat wash water. *International Food Research Journal* 17: 147-152

- 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.
- Junianto, Haetami, K. Dan Maulina, I. 2006. *Karakteristik Cangkang Kapsul Yang Terbuat Dari Gelatin Tulang Ikan*. Bandung: Universitas Padjadjaran.
- Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D., Shahidi, F. 2007. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally *Selaroides leptolepis* as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food Chem*. 102 (4): 1.317–1.327
- Koesoemawardani, D., Nurainy, F., dan Hidayati, S. 2011. Proses Pembuatan Hidrolisat Protein Ikan Rucah. *Jurnal Natur Indonesia*. Vol. 13(3):256-261.
- Koleva, I.I., van Beek, T.A., Linssen JPH., de Groot A, dan Evstatieva, L.N. 2002. Screening of Plant Extracts for Antioxidant Activity: A Comparative Study on Three Testing Methods. *Phytochemical Analysis*. 13: 8-17.
- Kristinsson, HG., Danyali N., Ua-Angkoon S. 2007. “Effect of Filtered woodsmoke treatment on chemical and microbial changes in mahi mahifillets”. *J Food Sci*.72:16-24.
- Laemmli, U.K. 1970. *Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the head of Bacteriophage T4*. *Nature*, 227,680-685.
- Lafarga, T., Aluko, E.R., Rai, D.K., O'Connor, P., & Hayes, M. 2016. Identification of bioactive peptides from a papain hydrolysate of bovine serum albumin & assessment of an. *J. Food Research International*.
- Lestari, W. 2016. *Optimasi Hidrolisis Protein Ikan Wader (Rasbora jacobsoni) Dengan Kombinasi Protease Biduri-Papain Serta Penggunaan Sitein dan Gelatin*. Jember: Universitas Jember.
- Leipner and Salller. 2000. *Systemic Enzyme Therapy in Oncology: Effect and Mode of Action*. *Drugs* 2000 Apr; 59 (4):769-80.
- Mine, Y and Shahidi, F. 2006. *Nutraceutical Proteins and Peptides in Health and Desease*. Boca Raton: CRC Press.
- Murtini, E.S., dan Qomaruddin. 2003. Pengempukan Daging dengan Enzim Protease Tanaman Biduri (*Calotropis gigantea*). *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*. Vol. 14 (3): 266-268.
- Myers. 1997. *Reef Fishes of The World*. Jakarta: C.V Java Book.

- Nielsen. 1997. *Food Protein and Their Application*. New York: University of Madison.
- Nolsoe, H., Undeland, I. 2009. The acid and alkaline solubilisation process for the isolation of muscle proteins: *State of the art. Food Bioprocess Technol* 2: 1-27. DOI: 10.1007/s11947-008-0088-4.
- Ojha, K. S., Alvarez, C., Kumar, P., O'Donnell, C. P., & Tiwari, B. K. 2016. Effect of enzymatic hydrolysis on the production of free amino acids from boarfish (*Capros aper*) using second order polynomial regression models. *LWT - Food Science and Technology*, 68, 470–476.
- Oyaizu, M. 1986. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japan Journal Nutrition*. Vol. (44): 307-315.
- Pigot, G.M and Tucker, B.W. 1990. *Utility fish flesh effectively while maintaining nutritional qualities Seafood Effects of Technology on Nutrition*. New York : Marcel Decker, Inc.
- Purwanto. 2014. *Evaluasi Hasil Belajar*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Rohmatussolihat. 2009. *Antioksidan dan Penyelamat Sel-sel Tubuh Manusia*. *Biotrends* Vol.4 No. 1 Tahun 2009.
- Saputri, D.S. 2007. *Spesifitas Enzim Protease Biduri (Calotropis gigantea)*. Jember: Universitas Jember.
- Sawant, R., dan Nagendran, S. 2014. Protease: An Enzyme With Multiple Industrial Applications. *World Journal of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences*. Vol. 3 (6): 568-579.
- Shimada, F., Fujikawa, K., Yahara, K., Nakamura, T. 1992. Antioxidative Properties of Xanthan on the Antioxidation of Soybean Oil in Cyclodextrin Emulsion. *Journal Agricultural Food Chemistry*. Vol. 40 (1): 945-948.
- Soeparno. 2009. *Ilmu dan Teknologi Daging*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. 6; 152-156; 289-290; 297–299.
- Standar Nasional Indonesia. 2006. *SNI 01-2729.3 -2006*. Ikan Segar – Bagian 3: Penanganan dan pengolahan. Jakarta: Badan Standardisasi Nasional.
- Subagio, A., Hartanti, S., Windrati, W. S., Unus., Fauzi, M., Herry, B. 2002. Kajian Sifat Fisikokimia dan Organoleptik Hidrolisat Tempe Hasil Hidrolisis Protease. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*. Vol. 13(3): 204-210.

- Sudarmadji, S., B. Haryono dan Suhardi. 1997. *Prosedur Analisa Untuk Bahan Makanan dan Pertanian Edisi Keempat*. Yogyakarta: Liberty.
- Susanti, S.P. 2005. *Karakterisasi Enzim Protease dari Getah Tanaman Biduri (Calotropis gigantea) Hasil Ekstraksi Menggunakan Amonium Sulfat*. Jember: Universitas Jember.
- Syahrizal FSNA. 1991. Mikrobiologi Kecap Ikan Yang Dibuat Secara Hidrolisis Enzimatis. *Skripsi*. Bogor : Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor.
- Tatiya, A.U., Tapadiya, G.G., Kotecha, S., dan Surana, S.J. 2011. Effect of Solvents on Total Phenolics, Antioxidant and Antimicrobial Properties of *Bridelia retusa* Spreng. Stem Bark. *Indian Journal of Natural Product and Resources*. Vol. (2): 442-447.
- Tjitrosoepomo, G. 1996. *Taksonomi Tumbuhan (Spermatophyta)*. Yogyakarta: Gajah Mada University Press, 477 hlm.
- Torino, M.I., Limon, R.I., Martinez-villaleunga, C., Makinen, S., Pihlanto, A., Vidal-valverde, C., and Frias, J. 2012. Antioxidant and antihypertensive properties of liquid and solid state fermented lentils. *Food Chemistry*.136(2): 1030-1037.
- Tounkara, F., Bernard, S., Tidjani, A., Guo-Wei, L., and Yong-Hui Shi. 2013. Antioxidant Effectand Water-Holding Capacity of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) Seed Protein Hydrolysates. *Advance Journal of Food Science and Technology* 5(6):752-757, 2013
- Uhlig, H. 2001. *Industrial Enzymes and Their Application*. New York: John Wiley and Son Inc.
- Van der Maesen dan Somaatmadja. 1993. *Proses Sumber Daya Nabati Asia Tenggara*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.
- Venugopal, V. 2006. *Seafood Processing : Adding Value Throgh Quick Freezing, Retortable Packaging, and Cook-Chilling*. Boca Raton: CRC Pr.
- Wijayanti, A.T. 2009. *Kajian Penyaringan dan Lama Penyimpanan Dalam Pembuatan Fish Pepton dari Ikan Selar Kuning (Caranx leptolepis)*. Skripsi. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Winarno, F.G. 1995. *Enzim Pangan*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.
- Winarno, F.G. 1997. *Kimia Pangan dan Gizi*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.

- Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta: Kanisius.
- 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., Praptiningsih, Y., dan Hartanti, S., 2004. *Enzim Protease dari Tanaman Biduri (Calotropis gigantea)*. Jakarta : Prosiding Seminar Nasional - Perhimpunan Ahli Teknologi Pangan Indonesia (PATPI).
- Witono, Y., Subagio, A., Susanto, T., dan Widjanarko, S. B. 2006. *Membandingkan Kinerja Protease Biduri dengan Protease Komersial*. [Prosiding]. Seminar Nasional -Perhimpunan Ahli Teknologi Pangan Indonesia (PATPI), Yogyakarta 2-3 Agustus 2006.
- Witono, Y., Aulanni'am., Subagio, A dan Widjanarko, S. B. 2007a. Purifikasi Dan Karakterisasi Parsial Enzim Protease Dari Tanaman Biduri (*Calotropis gigantea*). *J Teknol Industri Pangan*18: 1-9.
- Witono Y, Woo Won Kang. 2010. Specific Characteristic of Novel Cystein Protease From Indonesian 'Biduri' Plant (*Calotropis gigantea*). [Proceeding] *The Korea Food Conference and Symposium*, In cheon Korea 17-18 June 2010.
- Witono, Y., Taruna, I., Widrati, W. S dan Ratna, A. 2014. *Hidrolisis Ikan Bernilai Ekonomi Rendah Secara Enzimatis Menggunakan Protease Biduri*. Jember: Universitas Jember.
- Wong, D.W.S. 1989. *Mechanism And Theory In Food Chemistry*. New York: Academic Press.
- Wu Hui-chun., Chen, H.M., and Shiau, C.Y. 2003. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Research*. 36: 949-957

## LAMPIRAN

**Lampiran A. Data Hasil Perhitungan Aktivitas Enzim Biduri dan Papain**

## A.1 Data Aktivitas Enzim Biduri dan Papain

**Tabel A.1** Aktivitas Enzim Biduri dan Papain

Nilai Absorbansi			
Blanko	Tirosin	Biduri	Papain
0,206	0,261	0,600	2,467

## A.2 Perhitungan Aktivitas Enzim Biduri dan Papain

**Tabel A.2** Perhitungan Aktivitas Enzim Biduri dan Papain

Nilai Absorbansi	
Biduri	Papain
15,06	86,32

**Lampiran B. Perhitungan Total Enzim Biduri dan Papain**

Berdasarkan penelitian Lestari (2016), perlakuan terbaik penggunaan enzim pada protein ikan adalah 3% (v/b). Daging ikan yang digunakan sebanyak 50 gram. Total enzim 3% x 50 gram daging ikan = 1,5 ml total enzim.

**- 10% enzim biduri dan 90% enzim papain**

$$\begin{aligned} 10\% \text{ enzim biduri} &= 10\% \times 1,5 \text{ total enzim} \\ &= 0,15 \text{ ml} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 90\% \text{ enzim papain} &= 90\% \times 1,5 \text{ total enzim} \\ &= 1,35 \text{ ml} \end{aligned}$$

**- 20% enzim biduri dan 80% enzim papain**

$$\begin{aligned} 20\% \text{ enzim biduri} &= 20\% \times 1,5 \text{ total enzim} \\ &= 0,3 \text{ ml} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 80\% \text{ enzim papain} &= 80\% \times 1,5 \text{ total enzim} \\ &= 1,20 \text{ ml} \end{aligned}$$

**- 30% enzim biduri dan 70% enzim papain**

$$\begin{aligned} 30\% \text{ enzim biduri} &= 30\% \times 1,5 \text{ total enzim} \\ &= 0,45 \text{ ml} \end{aligned}$$

$$70\% \text{ enzim papain} = 70\% \times 1,5 \text{ total enzim}$$

$$= 1,05 \text{ ml}$$

**- 40% enzim biduri dan 60% enzim papain**

$$\begin{aligned} 40\% \text{ enzim biduri} &= 40\% \times 1,5 \text{ total enzim} \\ &= 0,60 \text{ ml} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 60\% \text{ enzim papain} &= 60\% \times 1,5 \text{ total enzim} \\ &= 0,90 \text{ ml} \end{aligned}$$

**- 50% enzim biduri dan 50% enzim papain**

$$\begin{aligned} 50\% \text{ enzim biduri} &= 50\% \times 1,5 \text{ total enzim} \\ &= 0,75 \text{ ml} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 50\% \text{ enzim papain} &= 50\% \times 1,5 \text{ total enzim} \\ &= 0,75 \text{ ml} \end{aligned}$$

**- 60% enzim biduri dan 40% enzim papain**

$$\begin{aligned} 60\% \text{ enzim biduri} &= 60\% \times 1,5 \text{ total enzim} \\ &= 0,90 \text{ ml} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 40\% \text{ enzim papain} &= 40\% \times 1,5 \text{ total enzim} \\ &= 0,60 \text{ ml} \end{aligned}$$

**- 70% enzim biduri dan 30% enzim papain**

$$\begin{aligned} 70\% \text{ enzim biduri} &= 70\% \times 1,5 \text{ total enzim} \\ &= 1,05 \text{ ml} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 30\% \text{ enzim papain} &= 30\% \times 1,5 \text{ total enzim} \\ &= 0,45 \text{ ml} \end{aligned}$$

**- 80% enzim biduri dan 20% enzim papain**

$$\begin{aligned} 80\% \text{ enzim biduri} &= 80\% \times 1,5 \text{ total enzim} \\ &= 1,20 \text{ ml} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 20\% \text{ enzim papain} &= 20\% \times 1,5 \text{ total enzim} \\ &= 0,30 \text{ ml} \end{aligned}$$

**- 90% enzim biduri dan 10% enzim papain**

$$\begin{aligned} 90\% \text{ enzim biduri} &= 90\% \times 1,5 \text{ total enzim} \\ &= 1,35 \text{ ml} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 10\% \text{ enzim papain} &= 10\% \times 1,5 \text{ total enzim} \\ &= 0,15 \text{ ml} \end{aligned}$$



**Lampiran C. Data Hasil Perhitungan Aktivitas Antioksidan Metode DPPH  
(2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl)**

**Tabel C.** Aktivitas Antioksidan Metode DPPH (2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl)

Sampel	Absorbansi			Rata- Rata	SD
	U1	U2	U3		
(10% B : 90% P)	12,25%	14,24%	34,43%	20,31%	0,123
(20% B : 80% P)	17,24%	26,33	22,58%	22,05%	0,046
(30% B : 70% P)	14,87	14,25%	15,42	14,85%	0,006
(40% B : 60% P)	14,75%	18,92%	19,40%	17,69%	0,026
(50% B : 50% P)	15,16%	17,29%	12,83%	15,09%	0,022
(60% B : 40% P)	14,27%	23,83%	20,79%	19,63%	0,049
(70% B : 30% P)	19,03%	19,35%	18,72%	19,03%	0,003
(80% B : 20% P)	14,63%	24,37%	29,75%	22,92%	0,077
(90% B : 10% P)	15,66%	17,63%	17,11%	16,80%	0,010

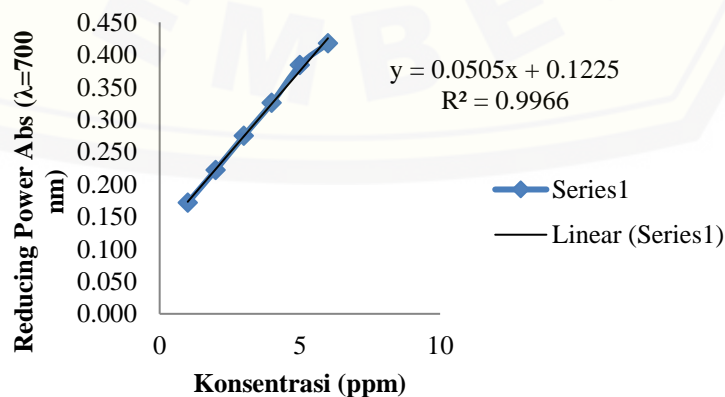
**Lampiran D. Data Hasil Perhitungan Aktivitas Antioksidan Metode  
Reducing Power**

**D.1 Kurva Standart Asam Askorbat**

**Tabel D.1** Kurva Standart Asam Askorbat

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
2	0,017
4	0,172
6	0,222
8	0,275
10	0,384
12	0,418

**Gambar D.1** Kurva Standart Asam Askorbat



D.2 Antioksidan Metode *Reducing Power***Tabel D.2** Antioksidan Metode *Reducing Power*

Sampel		Absorbansi sampel	Absorbansi blanko	Rata-rata Sampel	SD
(10% B : 90% P)	U1	0,383	0,030	0,397	0,114
	U2	0,291	0,023		
	U3	0,517	0,039		
(20% B : 80% P)	U1	0,377	0,030	0,352	0,044
	U2	0,301	0,023		
	U3	0,378	0,039		
(30% B : 70% P)	U1	0,454	0,030	0,360	0,101
	U2	0,254	0,023		
	U3	0,372	0,039		
(40% B : 60% P)	U1	0,408	0,030	0,356	0,058
	U2	0,294	0,023		
	U3	0,367	0,039		
(50% B : 50% P)	U1	0,461	0,030	0,360	0,091
	U2	0,285	0,023		
	U3	0,334	0,039		
(60% B : 40% P)	U1	0,384	0,030	0,361	0,037
	U2	0,318	0,023		
	U3	0,380	0,039		
(70% B : 30% P)	U1	0,302	0,030	0,328	0,033
	U2	0,316	0,023		
	U3	0,365	0,039		
(80% B : 20%P)	U1	0,366	0,030	0,442	0,133
	U2	0,364	0,023		
	U3	0,596	0,039		
(90% B : 10% P)	U1	0,357	0,030	0,367	0,036
	U2	0,336	0,023		
	U3	0,407	0,039		

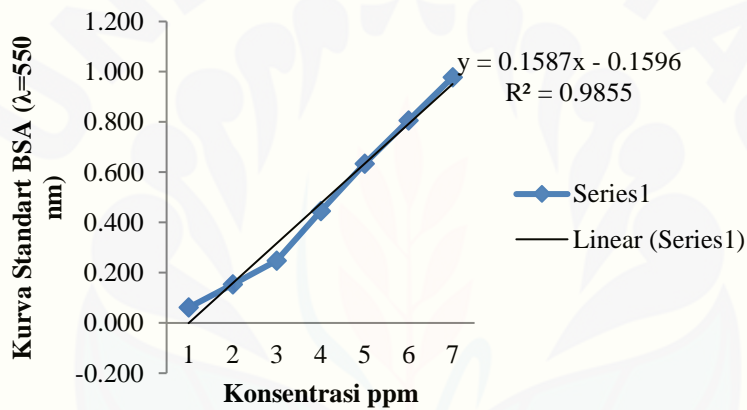
## Lampiran E. Data Hasil Perhitungan Kelarutan Protein

### E.1 Kurva Standar BSA (*Bovine Serum Albumin*)

**Tabel E.1** Kurva Standar BSA (*Bovine Serum Albumin*)

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
100	0,154
200	0,248
400	0,446
600	0,634
800	0,806
1000	0,978

**Gambar E.1** Kurva Standar BSA (*Bovine Serum Albumin*)



### E.2 Data Hasil Perhitungan Protein Terlarut

**Tabel E.2** Data Hasil Perhitungan Protein Terlarut

Sampel	Absorbansi			Rata-Rata	Nilai x (µg)	Hasil (%)
	U1	U2	U3			
(10% B : 90% P)	1,592	1,558	2,001	1,717	9,810	0,981
(20% B : 80% P)	2,115	2,351	2,341	2,269	13,290	1,329
(30% B : 70% P)	1,568	2,472	2,176	2,072	12,047	1,205
(40% B : 60% P)	1,859	2,327	2,059	2,082	12,110	1,211
(50% B : 50% P)	1,592	2,374	2,039	2,002	11,606	1,161
(60% B : 40% P)	2,161	2,053	1,783	1,999	11,589	1,159
(70% B : 30% P)	2,332	1,240	1,659	1,743	99,79	0,998
(80% B : 20% P)	1,714	1,991	1,827	1,844	10,611	1,061
(90% B : 10% P)	2,035	2,257	2,169	2,153	12,562	1,256

**Contoh Perhitungan:**

1. Persamaan regresi linear

$$y = 0,1587x - 0,1596$$

$$R^2 = 0,9855$$

$$Y = ax - b$$

$$2,269 = 0,1587x - 0,1596$$

$$x = 13,290 \mu\text{g}$$

2. Presentase enzim

$$\begin{aligned} \text{Presentase enzim} &= \frac{\text{nilai } y \times \text{jumlah pelarut}}{\text{berat sampel} \times 1000} \times 100\% \\ &= \frac{13,290 \times 10}{0,1 \times 1000} \times 100\% \\ &= 1,329 \% \end{aligned}$$

**Lampiran F. Data Hasil Perhitungan Daya Ikat Air****Tabel F.** Data Hasil Perhitungan Ikat Air

Sampel		Berat awal	Berat akhir	Air yang hilang (%)	Daya ikat air (%)
(10% B : 90% P)	U1	5,03	3,34		
	U2	5,17	3,27	0,35	99,65
	U3	5,15	3,30		
(20% B : 80% P)	U1	5,03	3,43		
	U2	5,05	3,60	0,28	99,72
	U3	5,02	3,81		
(30% B : 70% P)	U1	5,04	3,60		
	U2	5,01	3,43	0,29	99,71
	U3	5,03	3,74		
(40% B : 60% P)	U1	5,05	3,49		
	U2	5,07	3,40	0,29	99,71
	U3	5,03	3,84		
(50% B : 50% P)	U1	5,14	3,56		
	U2	5,18	3,46	0,31	99,69
	U3	5,06	3,55		
(60% B : 40% P)	U1	5,10	3,41		
	U2	5,06	3,42	0,32	99,68
	U3	5,05	3,55		
(70% B : 30% P)	U1	5,02	3,56		
	U2	5,06	3,27	0,29	99,71
	U3	5,06	3,98		
(80% B : 20% P)	U1	5,08	3,56		
	U2	5,10	3,46	0,29	99,71
	U3	5,05	3,73		
(90% B : 10% P)	U1	5,02	3,39		
	U2	5,07	3,39	0,30	99,70
	U3	5,04	3,85		
(10% B : 90% P)	U1	5,05	3,54		
	U2	5,04	3,39	0,29	99,71
	U3	5,05	3,77		

**Contoh perhitungan:**

$$\text{Air yang hilang} = \frac{(\text{berat akhir} - \text{berat awal})}{(\text{berat awal})} \times 100\%$$

$$\text{Air yang hilang} = \frac{(5,03 - 3,61)}{(5,03)} \times 100\%$$





$$= 0,28\%$$


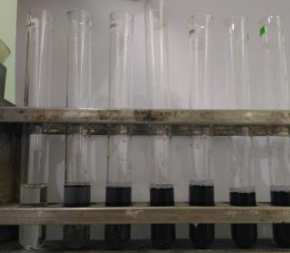



$$\text{WHC} = 100 - \text{air yang hilang}$$

$$= 100 - 0,28\%$$

$$= 99,72\%$$

**Lampiran G. Dokumentasi**

		
<p>Proses hidrolisis</p>	<p>Setelah hidrolisis</p>	<p>Pengeringan sampel dengan freeze drying</p>
		
<p>Inkubasi dalam waterbath</p>	<p>Pengujian antioksidan metode DPPH</p>	<p>Kurva standart asam asam askorbat</p>

		
<p>Pengujian antioksidan metode <i>Reducing Power</i></p>	<p>Kurva standart BSA</p>	<p>Sentrifugasi 4000rpm</p>
		
<p>Pengujian protein terlarut</p>	<p>Pengujian daya ikat air</p>	

