

AKTIVITAS ANTIOKSIDAN HIDROLISAT PROTEIN IKAN WADER (*Rasbora jacobsoni*) DARI HIDROLISIS OLEH ENZIM CALOTROPIN DAN PAPAIN
*Antioxidant Activity of Protein Hydrolysates Common Barb Fish (*Rasbora jacobsoni*) from Hydrolysis by Calotropin and Papain Enzymes*

**Yuli Witono^{1)*}, Maryanto Maryanto¹⁾, Iwan Taruna²⁾, Ardiyan Dwi Masahid¹⁾,
Kinanti Cahyaningati¹⁾**

¹⁾Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember

²⁾Jurusan Teknik Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember

Jalan Kalimantan No. 37, Kampus Tegal Boto Jember 68121

*Korespondensi Penulis: yuliwitono.ftp@unej.ac.id

ABSTRACT

The potency of common barb fish as fish protein hydrolyzate caused by its high protein content. Fish protein hydrolyzate is produced through the hydrolysis process by the calotropin enzyme and the papain enzyme. This study used common barb fish with one type of treatment, i.e. the difference combination of the calotropin (C) and papain (P) enzyme. Making fish protein hydrolyzate is used to determine the antioxidant activity of the common barb fish protein hydrolyzate. The observation parameters in this study were enzyme activity, antioxidant activity, degree of hydrolysis, molecular weight, amino acids, dissolved protein content, and water holding capacity. Samples with a ratio of 40C: 60P enzyme concentration are wader fish protein hydrolyzate with the proportion of 40% calotropin enzyme and 60% papain enzyme is the highest sample that has an antioxidant activity of 36.41%, reduced power value of 0.57, hydrolysis degree of 74.40% and total amino acids of 82.79%. Wader fish hydrolyzate in the 70C: 30P sample of 76.98% has a high water holding capacity because it can maintain the protein component in meat.

Keywords: *antioxidant, calotropin, common barb fish, fish protein hydrolyzate, papain*

PENDAHULUAN

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

untuk diolah menjadi hidrolisat protein ikan.

Hidrolisat protein ikan merupakan produk yang dihasilkan dari penguraian protein ikan menjadi peptida sederhana dan asam amino melalui proses hidrolisis oleh enzim, asam, atau basa. Hidrolisis secara enzimatis dapat dilakukan dengan menggunakan jenis enzim protease seperti enzim calotropin dan enzim papain. Berdasarkan letak pemutusan ikatan peptida, protease dibedakan menjadi edopeptidase dan eksopeptidase. Enzim papain tergolong endopeptidase (Poedjiadi, 2006), sedangkan enzim calotropin tergolong eksopeptidase (Witono, 2009). Endopeptidase adalah jenis protease yang memutuskan ikatan peptida yang berada di dalam rantai protein sehingga dihasilkan peptida dan polipeptida, sedangkan eksopeptidase

adalah jenis protease yang menguraikan protein ujung rantai sehingga dihasilkan suatu asam amino dan sisa peptida (Rao *et al.* 1998).

Hidrolisat protein ikan juga memiliki aktivitas antioksidan yang bermanfaat untuk mencegah ketengikan pada makanan (Venugopal, 2006). Aktivitas antioksidan sangat erat kaitannya dengan ikatan peptida yang terdapat pada protein serta asam amino yang terkandung di dalamnya. Enzim calotropin dan enzim papain diketahui berperan dalam menghidrolisis protein ikan wader sehingga diperoleh aktivitas antioksidan hidrolisat protein ikan yang tinggi. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian terhadap perbedaan kombinasi konsentrasi enzim calotropin dan enzim papain untuk menghasilkan hidrolisat protein ikan wader dan kemampuannya sebagai antioksidan.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan pH meter (Jen Way tipe 3320), spektrofotometer dan kuvetnya (Shimadzu), blender stainless steel (Philips), sentrifuge dan tabungnya (Yenaco model YC-1180), neraca analitik Ohaus, vortex (Thermolyne type 16700), peralatan gelas kaca (Pyrex dan Duran), lemari pendingin, waterbath (GFL 1083), heater listrik (Maspion), HPLC (*high performance liquid chromatography*), dan SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel*).

Bahan yang digunakan adalah ikan wader, daging ayam, enzim calotropin, dan enzim papain. Ikan wader didapatkan dari pasar tanjung Jember, enzim biduri diperoleh dari ekstrak getah tanaman biduri di Pantai Puger, dan enzim papain diperoleh dari ekstrak getah tanaman pepaya. Bahan kimia yang digunakan antara lain akuades, DPPH 0,1 mM, HCl, asam askorbat, TCA (asam trikloroasetat) 10%, BHT (*butylated hydroxytoluene*), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, kasein,

Na_2CO_3 , follin ciocalteau, tirosin, etanol p.a, potassium ferricyanide [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$] 1%, FeCl_3 0,1%, BSA (*Bovine Serum Albumin*), NaOH 0,1 N, CuSO_4 1%, Sodium Potassium Tartrat, FeCl 0,1%, HCl 0,02 N, NaOH 40%, H_3BO_3 4%, etanol 97%, buffer ekstraksi (50 mM MOPS-NaOH pH 7,5, 1 mM EDTA, 10 mM MgCl , dan 1 mM *Phenyl Methyl Sulfonyl Flouride* (PMSF), reagen Bradford, Buffer loading (Tris-Cl 0,5 M pH 6,8; SDS 10% glycerol 10%; bromophenol blue), acrylamide 15% buffer elektroda (Glycine 192 mM, Trisbase 25 mM, SDS 0,1%), *Coomassie Brilliant Blue* (CBB), Blue Prestained Protein Standart, ortoftalaldehida (OPA), larutan buffer kalium borat pH 10,4.

Tahapan Penelitian

Produksi Hidrolisat Protein Ikan

Ikan wader dilakukan *filleting* sehingga diperoleh daging ikan wader. Daging ikan ditimbang lalu dihancurkan menggunakan *food processor* dengan perbandingan akuades dan daging ikan adalah 2:1 dari berat ikan sehingga dihasilkan suspensi. Selanjutnya ditambahkan enzim calotropin dan enzim papain sesuai persentase perbandingan konsentrasi yang terdapat pada **Tabel 1**. Lalu 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. Selanjutnya hidrolisat protein ikan dilakukan proses sentrifugasi pada kecepatan 3500 rpm pada suhu 10°C selama 30 menit hingga menghasilkan supernatan dan residu. Supernatan yang diperoleh dilakukan pengeringan dengan menggunakan *freeze dryer* sehingga didapatkan hidrolisat protein ikan wader berbentuk kering.

Rancangan Percobaan

Penelitian ini menggunakan satu perlakuan yaitu perbedaan konsentrasi kombinasi enzim calotropin dan papain.

Jenis ikan yang digunakan adalah ikan wader. Pengujian menggunakan sembilan perbandingan konsentrasi enzim dengan tiga kali pengulangan dan dua kali pengamatan. Perbandingan kombinasi konsentrasi ditunjukkan pada **Tabel 1**.

Tabel 1. Persentase kombinasi enzim calotropin dan papain

Konsentrasi Enzim Calotropin:Papain
90% C : 10% P
80% C : 20% P
70% C : 30% P
60% C : 40% P
50% C : 50% P
40% C : 60% P
30% C : 70% P
20% C : 80% P
10% C : 90% P

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

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan *software* microsoft excel dan dianalisis menggunakan metode deskriptif. Setelah mendapatkan data, data ditampilkan dalam bentuk grafik dan menggunakan *error bar*.

Metode Analisis

Pengamatan yang dilakukan meliputi aktivitas enzim calotropin dan papain (Walter, 1984), kadar protein terlarut (Metode *lowry*; Purwanto, 2004), aktivitas antioksidan dengan metode DPPH (2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl) (Shimada *et al.* 1992), daya reduksi antioksidan metode reducing power (Oyaizu, 1986), derajat hidrolisis metode SN-TCA (Amiza *et al.* 2012), komposisi asam amino (AOAC 2005), berat molekul (Laemlli, 1970), daya ikat air (*Water Holding Capacity/WHC*) (Tounkara *et al.* 2013)

Aktivitas Enzim Calotropin dan Papain (Walter, 1984)

Terdapat tiga perlakuan dalam pengujian aktivitas enzim, yaitu blanko, standar tirosin, dan sampel. Perlakuan

blanko dan standar, enzim diganti dengan akuades dan tirosin 0,1 mM. Larutan tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit. Resi hidrolisis dihentikan dengan cara penambahan 1 mL TCA 0,1 M. Larutan enzim sebanyak 0,1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 0,5 mL kasein 1% b/v dan 0,5 mL buffer fosfat pH 7. Pada blanko dan standar ditambahkan 0,1 mL akuades lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit. Supernatan yang dihasilkan kemudian diambil sebanyak 0,75 mL dan ditambahkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 2,5 mL Na₂CO₃ 0,4 M, ditambahkan 0,5 mL pereaksi follin ciocalteau (1:2) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit. Hasil inkubasi diukur dengan spektrometer pada $\lambda = 670$ nm. Rumus pengukuran aktivitas enzim protease sebagai berikut :

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

Keterangan:

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

Kadar Protein Terlarut Metode Lowry (Purwanto, 2014)

Sampel hidrolisat protein ikan sebanyak 0,1 gram dilarutkan dalam 10 mL aquades. Setelah itu, larutan disentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 4000 rpm. Kemudian bagian supernatan dianalisis proteinnya dengan metode lowry. Penentuan protein metode lowry dimulai dengan pengambilan sampel dari supernatan yang dihasilkan sebelumnya sebanyak 250 μ l dan ditambah reagen lowry sebanyak 2 mL kemudian divortex dan diamkan selama 10 menit. Setelah itu ditambahkan 250 μ l follin dan

divortex. Selanjutnya didiamkan selama 20 menit lalu dilakukan pengukuran absorbansi dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang (λ) 550 nm.

Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH (2,2 diphenyl-1 picrylhydrazyl) (Shimada et al., 1992)

Penentuan aktivitas antioksidan dilakukan dengan pengenceran hidrolisat kering protein ikan sebanyak 20 kali dalam pelarut etanol p.a. larutan sampel hidrolisat protein yang telah diencerkan diambil masing-masing 1,5 mL dan direaksikan dengan larutan DPPH 0,1 mM dalam tabung reaksi. Kemudian dilakukan homogenisasi menggunakan vortex selama 1 menit dan diinkubasi selama 30 menit. Pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 517 nm untuk mengetahui persen inhibisi terhadap radikal bebas berupa DPPH. Aktivitas antioksidan DPPH dapat dihitung dengan menggunakan persamaan berikut :

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

Daya Reduksi Antioksidan Metode Reducing Power (Oyaizu, 1986)

Sampel hidrolisat kering protein ikan sebesar 2000 ppm diambil 1 mL kemudian ditambah 2,5 mL buffer pottasium fosfat 0,2 M (pH 6,6) dan 2,5 mL $K_3Fe(CN)_6$ 1%. Campuran larutan diinkubasi selama 20 menit pada suhu 50°C. Kemudian dilakukan penambahan 2,5 mL TCA 10% dan dihomogenisasi menggunakan vortex. Hasil homogenisasi diambil 2,5 mL dan ditambahkan 2,5 mL aquades dan 0,5 mL $FeCl_3$ 0,1%. Campuran larutan didiamkan selama 30 menit sebelum diabsorbansi dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 700 nm. 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 $K_3Fe(CN)_6$ (*potassium ferricyanide*).

Derajat Hidrolisis SN-TCA (Amiza et al., 2012)

Sebanyak 20 mg hidrolisat protein ditambahkan 20 mL TCA 10% (b/v). Pendiaman selama 30 menit. Setelah itu sentrifugasi 7800 rpm selama 15 menit. Supernatan yang diperoleh kemudian dianalisis kadar nitrogennya menggunakan metode semi mikro Kjeldahl (Sudarmadji et al., 1997). Sampel ditimbang sebanyak 0,1 gram, kemudian dimasukkan ke dalam labu Kjeldahl, lalu ditambahkan 0,9 gram selenium dan 5 mL H_2SO_4 pekat. Sampel didestruksi pada suhu 410°C selama kurang lebih 1 jam sampai larutan jernih lalu didinginkan. Setelah dingin, ke dalam labu. Kjeldahl ditambahkan 50 mL akuades dan 20 mL NaOH 40%, kemudian dilakukan proses destilasi dengan suhu destilator 100°C. Hasil destilasi ditampung dalam labu erlenmeyer 250 mL yang berisi campuran 15 mL asam borat (H_3BO_3) 4% dan 2 tetes indikator MmMb yang berwarna biru. Setelah volume destilat mencapai 40 mL dan berwarna kehijauan, maka proses destilasi dihentikan. Lalu destilat dititrasi dengan HCl 0,02 N sampai terjadi perubahan warna biru keunguan. Volume titran dibaca dan dicatat. Larutan blanko dianalisis seperti sampel.

Berat Molekul SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

a. Ekstraksi sampel

Sampel berupa hidrolisat protein ikan wader sebanyak 0,25 gram ditambahkan 750 μ l buffer ekstraksi mengandung 50 mM MOPS-NaOH (pH7,5), 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 analisis selanjutnya

supernatan yang diperoleh dipindah ke microtube baru dan disimpan dalam suhu -80°C.

b. Pengukuran kandungan protein

Sebanyak 5 µl supernatan ekstrak protein ditambah 995 µl reagen Bradford kemudian dilakukan homogenisasi dan dilanjutkan dengan inkubasi selama 15 menit. Proses tersebut akan menghasilkan perubahan warna. Selanjutnya warna yang telah terbentuk tersebut diukur menggunakan spektrofotometer ($\lambda = 595$ nm). Perhitungan kadar protein total pada sampel dilakukan dengan cara mengkonversikan nilai absorbansi sampel kedalam persamaan regresi linier dari standart protein BSA. Konsentrasi protein yang dihasilkan diperlukan untuk menentukan volume sampel yang akan dianalisis.

c. Analisis SDS-PAGE

Larutan hasil pengujian ekstraksi ditambah buffer loading (Tris-Cl 0,5M pH 6,8; SDS 10%; glycerol 10 %; bromophenol blue) dan didenaturasi dengan pemanasan 95°C selama 3 menit. Sampel protein kemudian sebanyak 40 µg dimasukkan ke dalam sumuran gel lalu dipisahkan dengan menggunakan (SDS-PAGE) dengan konsentrasi akrilamide 15 %. Pemisahan protein dengan SDS-PAGE dilakukan dengan arus listrik 40-70 V selama 4 jam dalam buffer elektorda (glycine 192 mM, Tris base 25 mM, SDS 0,1 %). Protein yang terpisah diwarnai dengan Coomassie Brilliant Blue (CBB). Protein marker menggunakan Gangnam Stain Prestained Protein Ladder sebanyak 3µl.

Asam Amino Metode High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (AOAC 2005 No. 982.30E)

a. Preparasi sampel

Kadar protein sampel ditentukan terlebih dahulu dengan metode Kjeldahl. Sampel yang mengandung 3 mg protein dimasukkan ke dalam tabung ulir, ditambah 1 mL HCl 6 N dan dialiri gas N₂,

kemudian ditutup. Sampel tersebut dihidrolisis dalam oven bersuhu 110°C selama 24 jam lalu disaring menggunakan 6 penyaring kaca masir. Sampel kemudian dipindahkan ke labu rotary evaporator untuk dikeringkan, ditambah dengan HCl 0,01 N dan ditera sampa 5 mL, dan disaring dengan kertas milipore No. 45

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

Kondisi alat HPLC pada saat dilakukan analisis:

Kolom : Ultra techspere
Fase mobil : Larutan A (Na-EDTA, metanol, THF) dan larutan B (metanol 95%, akuades)
Detektor : Fluoresensi

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

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

Persen asam amino dalam sampel dapat dihitung dengan rumus :

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

Daya Ikat Air (Water Holding Capacity/WHC) (Tounkara, 2013)

Penentuan uji daya ikat air menggunakan media daging ayam untuk mengetahui seberapa besar kemampuan daging yang ditambahkan dengan hidrolisat protein ikan wader dalam mengikat air bebas. Daging ayam

digunakan sebagai media karena memiliki harga yang terjangkau dibanding daging sapi, selain itu jika menggunakan daging ikan maka akan bias. Pencampuran hidrolisat protein ikan wader dengan kombinasi enzim calotropin dan papain pada daging ayam, diharapkan mampu meningkatkan kualitas daging ayam. Hidrolisat protein berpotensi sebagai *smart flavour* yang baik untuk diaplikasikan dalam bahan pangan. Daging ayam yang diolah menjadi suatu produk agar dapat dikonsumsi oleh manusia sebelumnya melewati perlakuan, salah satu diantaranya yaitu dengan cara perebusan. Tujuan dari perebusan pada daging adalah untuk mendapatkan kualitas fisik daging yang baik dan memberikan keempukkan pada daging (Dwiloka dan Atmomarsono, 2007).

Daging ayam terlebih dahulu dilakukan penghancuran menggunakan *food processor*, kemudian timbang ayam sebanyak 5 gram. Setelah itu ditambahkan aquades 1,5 mL dan sampel hidrolisat protein ikan wader 0,05 gram. Lalu dilakukan pendiaman di dalam *freezer* selama 30 menit. Setelah 30 menit, sampel dimasukkan ke dalam waterbath pada suhu 95°C selama 10 menit. Kemudian sampel dialiri menggunakan air dingin dan ditimbang berat akhirnya.

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

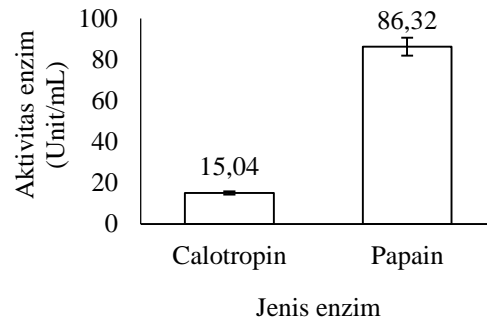
$$\text{WHC (\%)} = 100 - \text{air yang hilang}$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Aktivitas Enzim Calotropin dan Papain

Pengujian aktivitas enzim dilakukan untuk mengukur kemampuan dalam menghidrolisis protein menjadi peptida dan asam-asam amino sederhana. Aktivitas enzim calotropin dalam proses hidrolisis protein sebesar 15,04 U/mL dan enzim papain sebesar 86,32 U/mL. Kedua enzim

ini dinyatakan aktif karena memiliki aktivitas yang dapat digunakan untuk menghidrolisis protein. Hasil aktivitas enzim calotropin dan papain dapat dilihat pada **Gambar 1**.

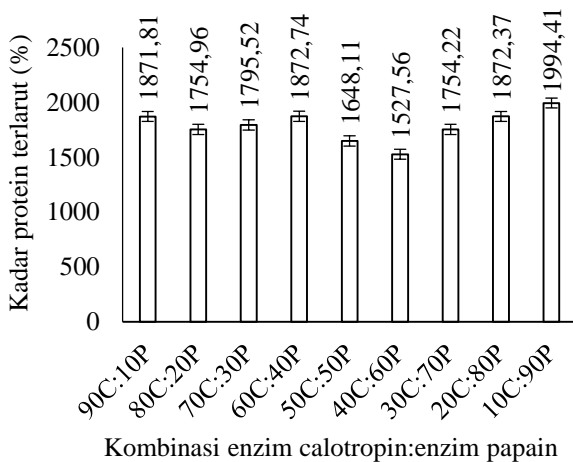


Gambar 1. Aktivitas enzim calotropin dan papain

Gambar 1 menunjukkan bahwa enzim papain memiliki aktivitas 5,73 kali lebih tinggi dibandingkan enzim calotropin. Pengukuran aktivitas enzim digunakan untuk mengukur jumlah konsentrasi yang ditambahkan pada sampel. Enzim calotropin dan papain yang digunakan untuk menghidrolisis protein ikan wader merupakan ekstrak yang belum dimurnikan. Menurut Witono *et al.* (2007) enzim dalam bentuk ekstrak kasar memiliki aktivitas enzim yang lebih tinggi dari pada enzim dalam bentuk murni, akan tetapi aktivitas spesifiknya lebih rendah.

Kadar Protein Terlarut Hidrolisat Protein Ikan Wader

Kelarutan protein mengacu pada jumlah protein total pada suatu bahan yang masuk ke dalam larutan dalam kondisi tertentu (Zayas, 1997) dan tergantung pada struktur protein, pH, konsentrasi garam, suhu, lama ekstraksi dan banyak faktor intrinsik lainnya. Semakin banyak protein yang larut dibagian supernatan, maka menunjukkan peningkatan kelarutan protein. Kadar protein terlarut pada hidrolisat protein ikan wader ditunjukkan pada **Gambar 2**.



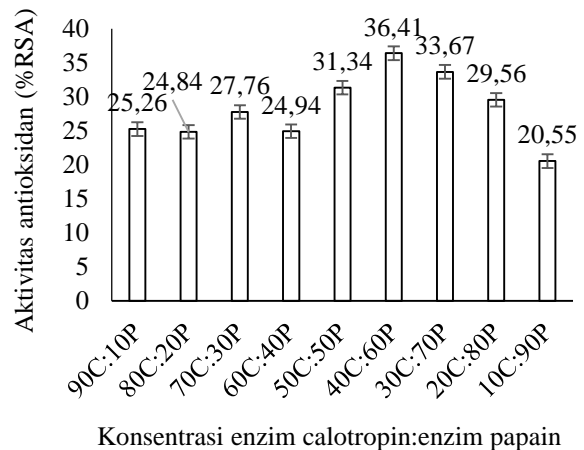
Gambar 2. Kadar protein terlarut pada hidrolisat protein ikan wader

Kadar protein terlarut tertinggi terdapat pada sampel hidrolisat protein ikan wader dengan perbandingan konsentrasi 10C:90P sebesar 1.994,41 µg/mL dengan kombinasi 10% enzim calotropin dan 90% enzim papain (**Gambar 2**). Kadar protein terlarut mengalami kenaikan dengan penambahan konsentrasi enzim papain mulai dari 60% hingga 90%. Murray *et al.* (2003) mengemukakan bahwa konsentrasi enzim berpengaruh terhadap reaksi inisiasi antara enzim dengan substrat yang akan menentukan kecepatan awal reaksi hidrolisis. Semakin besar protein terlarut maka semakin besar pula nilai gizi suatu bahan pangan. Semakin terurai struktur protein suatu bahan semakin mudah dicerna dan semakin banyak persentase protein terlarutnya. Semakin tinggi protein terlarut dalam air semakin tinggi nilai gizi produk yang akan dicerna oleh tubuh (Gelichpour dan Shabanpour, 2011). Kadar protein terlarut yang turun menunjukkan bahwa kualitas protein pada ikan juga mengalami penurunan.

Aktivitas Antioksidan Hidrolisat Protein Ikan Wader

Pengujian aktivitas antioksidan hidrolisat protein ikan wader menggunakan metode DPPH (2,2 diphenyl-1 picrylhydrazyl) bertujuan untuk

mengetahui aktivitas antioksidan tertinggi terhadap perlakuan perbedaan kombinasi enzim calotropin dan papain. Aktivitas antioksidan dalam mereduksi radikal bebas dari hidrolisat protein ikan ditentukan dengan kemampuannya dalam mereduksi DPPH. Nilai persen penghambatan hidrolisat protein ikan wader papain ditunjukkan pada **Gambar 3**.



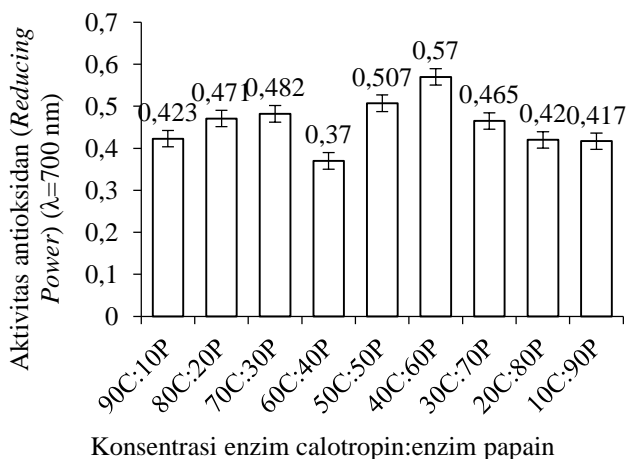
Gambar 3. Aktivitas antioksidan DPPH hidrolisat protein ikan wader

Aktivitas antioksidan paling optimal pada hidrolisat protein ikan wader dengan perbandingan konsentrasi 40C:60P yaitu 40% enzim calotropin dan 60% enzim papain sebesar 36,41% (**Gambar 3**), namun secara keseluruhan hasil uji aktivitas antioksidan mengalami keadaan yang tidak stabil, semakin tinggi konsentrasi enzim belum tentu aktivitas antioksidannya tinggi. Keadaan seperti ini dikaitkan dengan berat molekul dan asam amino yang dihasilkan pada proses hidrolisis. Komposisi asam amino tertinggi terdapat pada sampel hidrolisat protein ikan wader dengan perbandingan konsentrasi 40C:60P yaitu 40% enzim calotropin dan 60% enzim papain sebesar 82,79%. Menurut Wu *et al.* (2003) berat molekul dan komposisi asam amino pada peptida yang terbentuk selama hidrolisis sangat mempengaruhi aktivitas antioksidan pada hidrolisat protein. Semua protein yang dihidrolisis akan menghasilkan asam-

asam amino, tetapi ada beberapa protein yang disamping menghasilkan asam amino juga menghasilkan molekul-molekul protein yang masih berikatan (Kurniawan *et al.* 2012).

Daya Reduksi Antioksidan Hidrolisat Protein Ikan Wader

Penentuan aktivitas antioksidan metode *reducing power* digunakan untuk menganalisis senyawa antioksidan yang memiliki kemampuan mereduksi suatu bahan sebagai antioksidan sekunder. *Reducing power* (daya reduksi) hidrolisat protein ikan wader menggunakan kombinasi enzim calotropin dan papain ditunjukkan pada **Gambar 4**.



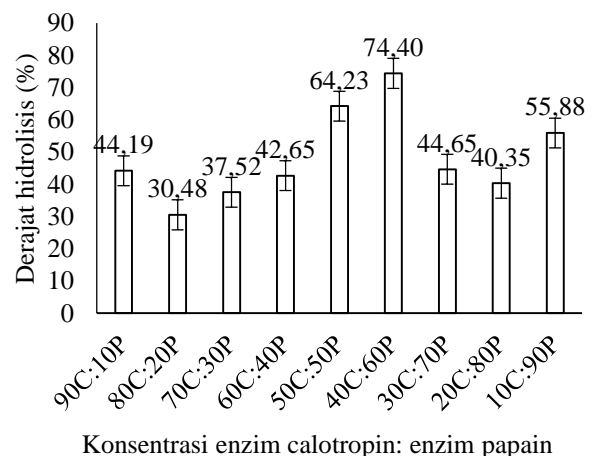
Gambar 4. Daya reduksi hidrolisat protein ikan wader

Hidrolisat protein ikan wader memiliki kemampuan untuk mereduksi sumber radikal bebas yang direaksikan sehingga menjadikannya lebih stabil. Hasil paling optimal ditunjukkan pada sampel hidrolisat protein ikan dengan perbandingan konsentrasi 40C:60P sebesar 0,57 (**Gambar 4**). Penentuan aktivitas antioksidan *reducing power* dalam hidrolisat protein dapat diketahui melalui komposisi dan urutan asam amino penyusun peptida. Menurut Xie *et al.* (2008) aktivitas *reducing power* peptida dalam hidrolisat protein disebabkan karena adanya residu asam amino tirosin,

methionin, sistein, histidin, lisin, dan triptofan yang menyusun peptida sehingga peptida tersebut mampu menjadi donor elektron bagi radikal bebas.

Derajat Hidrolisis Hidrolisat Protein Ikan Wader

Derajat hidrolisis merupakan parameter kunci dalam memantau reaksi hidrolisis, semakin tinggi derajat hidrolisis menunjukkan semakin efektif proses hidrolisis dalam memecah ikatan peptida (Charoenphun *et al.* 2013). Nilai derajat hidrolisis yang semakin tinggi menunjukkan bahwa pada proses hidrolisis protein yang berlangsung juga semakin baik. Derajat hidrolisis hidrolisat protein ikan wader ditunjukkan pada **Gambar 5**.



Gambar 5. Derajat hidrolisis hidrolisat protein ikan wader

Derajat hidrolisis tertinggi pada sampel hidrolisat protein ikan wader perbandingan konsentrasi 40C:60P dengan proporsi 40% enzim calotropin dan 60% enzim papain sebesar 74,40% (**Gambar 5**). Nilai derajat hidrolisis yang dihasilkan mengalami keadaan yang tidak stabil, keadaan ini disebabkan penggunaan dua enzim protease yang berbeda yaitu enzim calotropin dan enzim papain. Hal ini sesuai dengan pendapat Ovissipur *et al.* (2010) menyebutkan bahwa perbedaan jenis enzim yang digunakan dapat menyebabkan perbedaan nilai derajat hidrolisis pada

proses hidrolisis protein kepala ikan tuna sirip kuning (*Thunnus albacares*). Konsentrasi enzim dan substrat yang berbeda serta waktu hidrolisis yang berbeda menyebabkan perbedaan derajat hidrolisis (Hasnaliza *et al.* 2010).

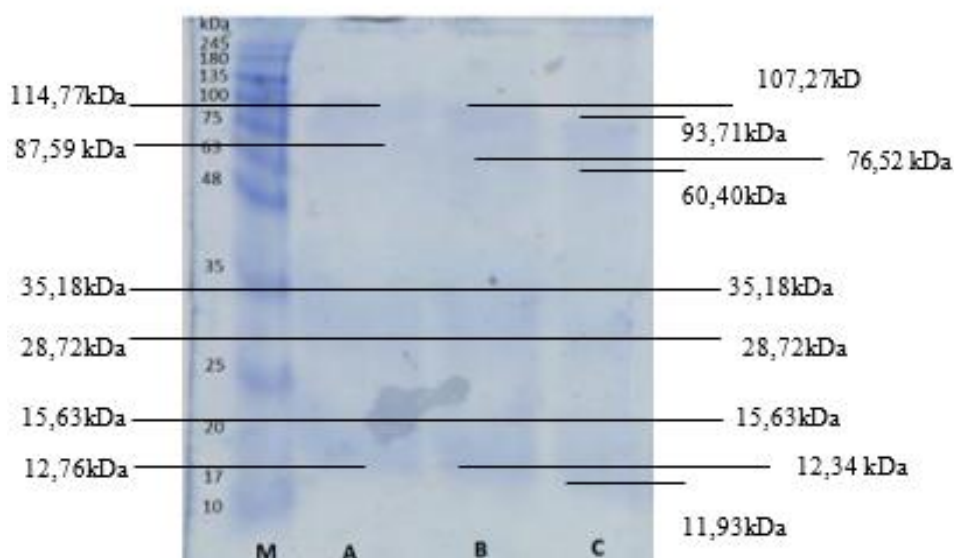
Menurut Kurniawan (2012) nilai derajat hidrolisis dipengaruhi oleh jumlah senyawa peptida dan asam amino sebagai hasil pemecahan protein oleh enzim. Karena derajat hidrolisis diukur dari perbandingan α -amino nitrogen dengan total nitrogen (AN/TN) maka dengan semakin tinggi tingkat pemecahan protein menjadi senyawa berantai pendek termasuk senyawa α -amino nitrogen, derajat hidrolisisnya menjadi semakin tinggi. Peningkatan derajat hidrolisis disebabkan oleh peningkatan peptida dan asam amino yang terlarut dalam TCA (*Trichloroacetic Acid*) akibat dari pemutusan ikatan peptida selama hidrolisis protein (Hasnaliza *et al.* 2010).

Berat Molekul Hidrolisat Protein Ikan Wader

Pengukuran berat molekul ini bertujuan untuk mengetahui berat molekul protein pada hidrolisat protein setelah

mengalami proses hidrolisis. Satuan yang digunakan adalah kilodalton (kDa). Ketiga hidrolisat protein ikan wader masing-masing memiliki 6 pita (band) protein. Sampel A yaitu hidrolisat protein ikan wader dengan perbandingan konsentrasi 10C:90P yaitu 10% enzim calotropin dan 90% enzim papain memiliki nilai berat molekul yaitu 12,76 kDa; 15,63 kDa; 28,72 kDa; 35,18 kDa; 87,59 kDa; dan 114,77 kDa. Pita protein pada sampel B dengan perbandingan konsentrasi 40C:60P yaitu 40% enzim calotropin dan 60% enzim papain memiliki berat molekul yaitu 12,34 kDa; 15,63 kDa; 28,72 kDa; 35,18 kDa; 76,52 kDa; dan 107,27 kDa, sedangkan pita protein pada sampel C dengan perbandingan konsentrasi 90C:10P yaitu 90% enzim calotropin dan 10% enzim papain memiliki nilai berat molekul yaitu 11,93 kDa; 15,63 kDa; 28,72 kDa; 35,18 kDa; 60,40 kDa; dan 93,71 kDa (**Gambar 6**).

Jika berat molekul ketiga sampel dikaitkan dengan aktivitas antioksidannya, maka hidrolisat protein ikan wader sampel 90C:10P memiliki aktivitas antioksidan lebih tinggi. Menurut Wu *et al.* (2003), berat molekul dan komposisi asam amino



Gambar 6. Berat molekul hidrolisat protein ikan wader dengan variasi 10% enzim calotropin dan 90% enzim papain (A), 40% enzim calotropin dan 60% enzim papain (B), 90% enzim calotropin dan 10% enzim papain (C) berdasarkan pengujian SDS-PAGE dengan marker 245 kDa (M)

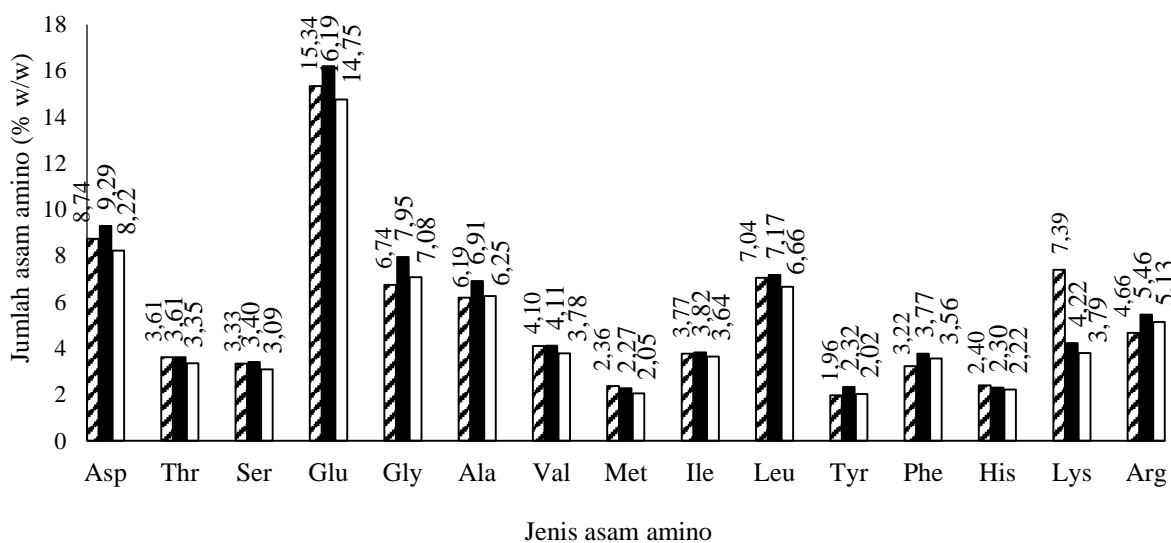
pada peptida yang terbentuk selama hidrolisis sangat mempengaruhi aktivitas antioksidan pada hidrolisat protein. Namun, pada analisis aktivitas antioksidan nilai tertinggi terdapat pada sampel hidrolisat protein ikan dengan perbandingan konsentrasi 40C:60P. Pernyataan ini dibuktikan pada penelitian (**Gambar 6**), ketika sampel 10C:90P memiliki nilai berat molekul 12,76 kDa; 15,63 kDa; 28,72 kDa; 35,18 kDa; 87,59 kDa; dan 114,77 kDa dengan nilai aktivitas antioksidan sebesar 20,55%, sampel 40C:60P memiliki berat molekul 12,34 kDa; 15,63 kDa; 28,72 kDa; 35,18 kDa; 76,52 kDa; dan 107,27 kDa dengan nilai aktivitas antioksidan sebesar 36,41% dan sampel 90C:10P memiliki nilai berat molekul 11,93 kDa; 15,63 kDa; 28,72 kDa; 35,18 kDa; 60,40 kDa; dan 93,71 kDa dengan nilai aktivitas antioksidan sebesar 25,26%. Hal ini tidak sesuai dengan pernyataan Ranathunga *et al.* (2006) yang menyatakan bahwa potensi antioksidan lebih tinggi didapatkan dari peptida dengan bobot molekul yang lebih rendah yang didapatkan dari fraksinasi membran karena dapat lebih mudah mengikat radikal bebas.

Jika berat molekul ketiga sampel dikaitkan dengan perbedaan konsentrasi

enzim calotropin dan enzim papain, maka sampel dengan penambahan enzim calotropin sebesar 90% memiliki berat molekul yang kecil. Sampel hidrolisat protein ikan wader dengan konsentrasi 90C:10P memiliki berat molekul nilai berat molekul antara 93,71-11,93 kDa. Hal ini mengindikasikan bahwa penambahan enzim calotropin yang termasuk enzim eksoprotease efektif dalam proses hidrolisis yang berfungsi untuk memecah protein menjadi peptida dan asam amino yang sederhana atau lebih kecil. Menurut Ranathunga *et al.* (2006), molekul yang memiliki berat lebih kecil dapat menghambat proses oksidatif dengan peningkatan reaktivitas.

Komposisi Asam Amino Hidrolisat Protein Ikan Wader

Hidrolisat protein ikan dari reaksi pemecahan enzimatis dapat mengkonversi protein ikan menjadi peptida yang lebih kecil yang biasanya mengandung 2-20 asam amino (Chalamaiah *et al.* 2012). Variasi komposisi asam amino yang berbeda dalam hidrolisat protein ikan, dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu bahan baku, enzim, dan kondisi hidrolisis (Klompong *et al.*, 2009a). Komposisi asam amino ditunjukkan pada **Gambar 7**.



Gambar 7. Komposisi asam amino hidrolisat protein ikan wader dengan perlakuan enzim calotropin dan papain: 10C:90P (▨), 40C:60P(■), 90C:10P(□)

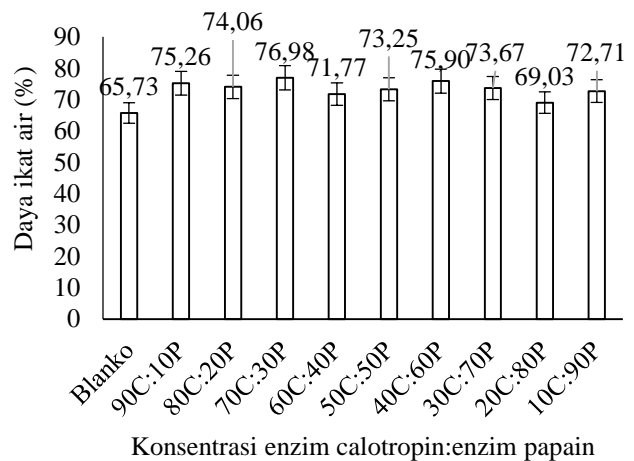
Asam glutamat merupakan asam amino dengan nilai tertinggi sebesar 16,19%, diikuti dengan asam aspartat sebesar 9,29% (**Gambar 7**). Wu *et al.* (2003) melaporkan bahwa asam amino bebas telah memiliki aktivitas antioksidan. Diantara semua asam amino, asam aspartat dan asam glutamat ditemukan lebih tinggi disebagian besar hidrolisat protein ikan yang dilaporkan (Ghassem *et al.*, 2011).

Aktivitas antioksidan hidrolisat ikan bergantung pada beberapa asam amino dengan gugus samping aromatik dan ikatan peptida yang berkontribusi terhadap penangkapan radikal kuat. Hidrolisat protein yang mengandung asam amino hidrofobik, seperti *leucine*, *alanine*, *tryptophan*, dan *phenylalanine* diyakini memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi (Mendis *et al.* 2005). Jika ketiga sampel dikaitkan dengan aktivitas antioksidan, maka sampel hidrolisat protein ikan wader dengan perbandingan konsentrasi 40C:60P yaitu 40% enzim calotropin dan 60% enzim papain memiliki aktivitas antioksidan tertinggi dengan nilai total asam amino sebesar 82,79 % w/w. Hal ini sesuai dengan hasil analisis aktivitas antioksidan dan hasil analisis asam amino yang menunjukkan bahwa hidrolisat protein ikan wader memiliki kadar asam glutamat dan asam aspartat yang paling tinggi. Hal ini sesuai dengan pernyataan Chalamaiah *et al.* (2012) yaitu di antara semua asam amino, asam aspartat dan asam glutamat yang ditemukan lebih banyak disebagian besar HPI yang sudah dilaporkan.

Daya Ikat Air Hidrolisat Protein Ikan Wader

Daya ikat air (*water holding capacity*) merupakan pengujian untuk mengetahui seberapa besar kemampuan daging dalam mengikat air bebas (Soeparno, 2009). Pengujian daya ikat hidrolisat protein ikan wader menggunakan media daging ayam.

Pengujian kualitas fisik dapat dilakukan dengan cara memperhatikan daya ikat air. Daging ayam yang memiliki daya ikat air rendah akan kehilangan banyak cairan, sehingga berat daging ayam akan hilang. Jika nilai daya ikat air semakin kecil, maka susut masak daging ayam semakin besar, sehingga kualitas daging ayam akan semakin rendah karena banyak komponen-komponen terdegradasi.



Gambar 8. Daya ikat air hidrolisat protein ikan wader

Gambar 8 menunjukkan bahwa daya ikat air tertinggi terdapat pada hidrolisat protein ikan wader dengan perbandingan konsentrasi 70C:30P dengan proporsi 70% enzim calotropin dan 30% enzim papain sebesar 76,98%, sedangkan hasil paling rendah terdapat pada blanko sebesar 65,73%. Penambahan enzim calotropin dan papain pada daging ayam cenderung memiliki nilai daya ikat air yang lebih tinggi dibandingkan blanko karena adanya pengikatan air yang disebabkan oleh kerja enzim pada saat pemasakan. Sampel dengan hasil daya ikat tinggi dianggap lebih mampu mempertahankan komponen di dalam daging sehingga susut masaknya kecil. Pada blanko menghasilkan nilai paling kecil karena tidak ditambahkan hidrolisat protein ikan.

Daging dengan daya ikat air rendah akan kehilangan banyak cairan, sehingga terjadi kehilangan berat. Semakin kecil

nilai daya ikat air, maka susut masak daging semakin besar, sehingga kualitas daging semakin rendah karena banyak komponen-komponen terdegradasi. Hasil pengujian membuktikan bahwa, penambahan hidrolisat protein ikan wader mampu meningkatkan daya ikat daging ayam sehingga mampu mempertahankan komponen protein di dalam daging ayam. Hal tersebut sejalan dengan hasil penelitian Tounkara *et al.* (2013) yang menunjukkan bahwa penambahan hidrolisat protein biji Rosela mampu meningkatkan daya ikat daging sapi. Hal tersebut dipengaruhi oleh konsentrasi dan jenis protein yang digunakan selama proses pemanasan daging. Kemampuan daya ikat air juga dipengaruhi oleh berat molekul. Peptida dengan berat molekul rendah lebih efektif meningkatkan daya ikat air karena bersifat lebih hidrofilik.

KESIMPULAN

Kombinasi konsentrasi 40C:60P dengan proporsi 40% enzim calotropin dan 60% enzim papain merupakan perlakuan terbaik. Aktivitas antioksidan hidrolisat protein ikan wader dengan metode DPPH, *reducing power*, derajat hidrolisis dan asam amino tertinggi dimiliki oleh sampel 40C:60P yaitu hidrolisat protein ikan wader dengan proporsi 40% enzim calotropin dan 60% enzim papain dengan nilai berturut-turut 36,41%, 0,57, 74,40%, dan 82,79 % w/w. Hidrolisat protein ikan wader memiliki kemampuan daya ikat air yang tinggi karena mampu mempertahankan komponen protein di dalam daging.

DAFTAR PUSTAKA

AOAC. 2005. Official method analysis. *association of official analytical chemists*. Benjamin Franklin Station, Washington.

- Amiza, M.A., Kong, Y.L., and Faazaz, A.L. 2012. Effect of hydrolysis on physicochemical properties of cobia (*Rachycentron canadum*) frame hydrolysate. *Journal International Food Research*, 19 (1): 199-206.
- Badan Pusat Statistik Kabupaten Jember. 2013. Produksi dan nilai produksi budidaya perikanan air tawar menurut jenis produksi dan jenis perairan. (<http://jemberkab.bps.go.id>) [Diakses pada 29 Juli 2019].
- Chalamaiah, M., Dinesh Kumar, B., Hemalatha, R., and Jyothirmaryl, T. 2012. Fish protein hydrolysates: proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A Review. *Food Chemistry*, 135: 3020-3038.
- Charoenphun, N., Benjamas, C., Nualpun, S., and Wirote. 2013. Calcium-binding peptides derived from tilapia (*Oreochromis niloticus*) protein hydrolysate. *European Food Research and Technology*, 236(1): 57-63.
- Dwiloka, B., dan Atmomarsono, U. 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.
- Gelichpour, M., and Shabanpour. 2011. The investigation of proximate composition and protein solubility in processed mullet fillet. *International Food Research Journal*, 18 (4): 1343-1347.
- Ghassem, M., Fern, S.S., Said, M., Ali, Z.M., Ibrahim, S., and Babji, A.S. 2011. Kinetic characterization of channa striatus muscle sarcoplasmic and myofibrillar protein hydrolysates. *Journal of Food Science and Technology*. [Doi: 10.1007/ s13197-011-0526-6].

- 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.
- Klompong, V., Benjakul, S., Yachai, M., Visessanguan, W., Shahidi, F., and Hayes, K.D. 2009. Amino acid composition and antioxidative peptides from protein hydrolysates of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*). *Journal of Food Science*, 74: C126-C133.
- Kurniawan, S., Lestari., dan Hanggita, S.R.J. 2012. Hidrolisis protein tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.) dengan enzim papain. *Fishtech*, 1 (1): 41-54.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of cateriophage T4. *Journal Nature*, 227: 680-685.
- 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*, 77: 2166-2178.
- Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A and Rodwell, V.W. 2003. *Biokimia Harper*. Penerbit Buku Kedokteran EGC, Ed 25, Jakarta.
- Ovissipour, M., Benjakul, S., Safari, R., and Motamedzadegan, A. 2010. Fish protein hydrolysates production from yellowfin tuna thunnus albacares 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 chromatography. *Journal Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaisshi*, Volume 35: 771-775
- Poedjiadi A. 2006. *Dasar-dasar Biokimia*. UI-Press, Jakarta.
- Purwanto. 2014. *Evaluasi Hasil Belajar*. Pustaka Pelajar, Yogyakarta.
- Ranathunga, S., Rajapakse, N., and., Kim, S.K. 2006. Purification and characterization of antioxidative peptide derived from muscle of conger eel (*Conger myriaster*). *Euro Food Res Technol*, 222: 310-315.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., and., Deshpande, V.V. 1998. Molecular and biotechnological aspect of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol Review*, 62:597-635.
- Shimada, K., Fujikawa, K., Yahars, K., and Nakamura, T. 1992. Antioksidative properties of xantan on the antioxidation of soy bean oil in eyelodextrin emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40: 945-948.
- Soeparno. 2009. *Ilmu dan Teknologi Daging*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. 6; 152-156; 289-290; 297-299.
- Toukara, 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.
- Venugopal, V. 2006. *Seafood Processing: Adding Value Through Quick Freezing, Retortable Packaging, and Cook-Chilling*. CRC Pr, Boca Raton.
- 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.
- Witono, Y., Aulanni'am, Subagio, A., dan Widjanarko, S.B. 2007. Preliminary Study for Enzymatic Processing of Milkfish Hydrolysate by Using "Biduri" Protease. *Prosiding Seminar Nasional Perhimpunan Ahli Teknologi Pangan Indonsesia (PATPI)*, Bandung 17-18 Juli 2007.
- Witono, Y. 2009. Spesifitas dan Stabilitas Protease Biduri (*Calotropis gigantea*). Tidak Diterbitkan. *Prosiding Seminar Nasional Perhimpunan Ahli Teknologi Pangan (PATPI)*, Denpasar.

- Witono, Y., Taruna I., Windrati. W.S., Azkiyah, L., and Sari, T.N. 2016. Wader (*Rasboa jacobsoni*) protein hydrolysates: Production, biochemical, and functional properties. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 9: 482-492.
- 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.
- Zayas, J.F. 1997. *Funcionally of Protein in Food*. Springer, Germany.