

**KARAKTERISASI DAN UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN HIDROLISAT PROTEIN
DARI IKAN BANDENG (*Chanos chanos*)**

**CHARACTERIZATION AND ANTIOXIDANT ACTIVITY TESTING OF PROTEIN
HYDROLYSATE FROM MILKFISH (*Chanos chanos*)**



**ISLAMUDDIN JAFAR
G032222006**

PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU DAN TEKNOLOGI PANGAN

FAKULTAS PERTANIAN

UNIVERSITAS HASANUDDIN

MAKASSAR

2024



**KARAKTERISASI DAN UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN HIDROLISAT PROTEIN
DARI IKAN BANDENG (*Chanos chanos*)**

**ISLAMUDDIN JAFAR
G032222006**



**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU DAN TEKNOLOGI PANGAN
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

**KARAKTERISASI DAN UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN HIDROLISAT PROTEIN
DARI IKAN BANDENG (*Chanos chanos*)**

Tesis

Sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar magister

Program Studi Magister Ilmu dan Teknologi Pangan

Disusun dan diajukan oleh

ISLAMUDDIN JAFAR
G032222006

Kepada

**PROGRAM MAGISTER ILMU DAN TEKNOLOGI PANGAN
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

TESIS

**KARAKTERISASI DAN UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN HIDROLISAT PROTEIN
DARI IKAN BANDENG (*Chanos chanos*)**

**ISLAMUDDIN JAFAR
G032222002**

telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Magister pada 20 Agustus 2024
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

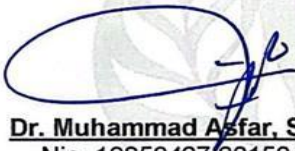
Pada

Program Studi Magister Ilmu dan Teknologi Pangan
Fakultas Pertanian
Universitas Hasanuddin
Makassar

Mengesahkan

Pembimbing Utama

Pembimbing Pendamping

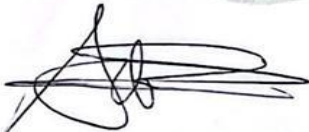


Dr. Muhammad Asfar, S.TP., M.Si
Nip. 19850427 201504 1 002



Prof. Dr. Ir. Meta Mahendradatta
Nip. 19660917 199112 2 001

Ketua Program Studi
Magister Ilmu dan Teknologi Pangan



Dr. Adiansyah Syarifuddin, STP., M.Si
Nip. 19770527 200312 1 001



Dekan Fakultas Pertanian
Universitas Hasanuddin

Prof. Dr. Ir. Salengke, M.Sc
Nip. 19631231 198811 1 005

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa, tesis berjudul "**Karakterisasi dan Uji Aktivitas Antioksidan Hidrolisat Protein Dari Ikan Bandeng (*Chanos chanos*)**" adalah benar karya saya dengan arahan dari tim pembimbing (Dr. Muhammad Asfar, S.TP.,M.si sebagai Pembimbing Utama dan Prof. Dr. Ir. Meta Mahendradatta sebagai Pembimbing Pendamping). Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka tesis ini. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa Sebagian atau keseluruhan tesis ini adalah karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut berdasarkan aturan yang berlaku.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta (hak ekonomis) dari karya tulis saya berupa tesis ini kepada Universitas Hasanuddin.

Makassar, 22 september 2024



Handwritten signature of Islamuddin Jafar.

Islamuddin Jafar
NIM. G032222006

UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillah, puji syukur dan terima kasih yang tak terhingga senantiasa penulis panjatkan kehadirat Allah 'Azza Wa Jallakarena atas berkah, karunia, dan rahmat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan tesis dengan judul "**KARAKTERISASI DAN UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN HIDROLISAT PROTEIN DARI IKAN BANDENG (*Chanos chanos*)**" yang dibuat guna memenuhi sebagian persyaratan untuk memperoleh gelar Magister Ilmu dan Teknologi Pangan, Universitas Hasanuddin.

Penyelesaian tesis ini tidak terlepas dari berbagai dukungan luar biasa yang senantiasa berada di sekeliling penulis, khususnya Ayahanda tercinta **Jafar**, Ibunda tercinta **Hj. Jumariah**, dan istri tercinta **Nirmala** yang senantiasa memberikan motivasi dan dukungan berupa spiritual, materil, dan non-materil lainnya hingga akhirnya penulis dapat menyelesaikan tesis ini dengan baik. Selain itu, penulis juga menyadari bahwa selesainya penulisan tesis ini karena bimbingan dan bantuan berbagai pihak Maka dari itu, perkenankan penulis untuk mengucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada:

1. Bapak **Prof. Dr. Ir. Salengke, M. Sc.**, selaku dekan Fakultas Pertanian Universitas Hasanuddin beserta Staf Dosen dan Tenaga Kependidikan yang telah memberikan kesempatan dan membantu penulis untuk belajar dan menyelesaikan pendidikan di Fakultas Pertanian Universitas Hasanuddin.
2. Ketua Departemen Teknologi Pertanian Bapak **Dr. Suhardi, S.TP., MP**, Ketua Program Studi Ilmu dan Teknologi Pangan Bapak **Dr. Adiansyah Syarifuddin, S.TP., M.Si.** dan seluruh jajaran **Staff Akademik, Bapak dan Ibu Dosen, Pegawai dan Laboran** yang telah banyak memberikan sumbangsih pengetahuan kepada penulis selama menempuh Pendidikan.
3. Bapak **Dr. Muhammad Asfar, S.TP., Msi.** selaku dosen Pembimbing utama yang telah memberikan arah, motivasi, serta saran dan masukan dalam penyusunan tesis ini.
4. Ibu **Prof. Dr. Ir. Meta Mahendradatta**, selaku dosen Pembimbing II yang telah memberikan arahan, motivasi, serta saran dan masukan dalam penyusunan tesis ini.
5. Bapak **Prof. Dr. Ir. Abu Bakar Tawali**, bapak **Dr. Adiansyah, S.TP., M.Si**, dan ibu **Dr. Andi Nurfaidah, S.TP., M.Si** selaku dosen penguji yang telah meluangkan waktu, tenaga, pikiran, serta masukan dan arahan dalam penyusunan tesis ini.
6. Teman-teman angkatan 2023 program magister Ilmu dan teknologi pangan, bunda Faramitha, Muh Iqbal, Albert Moling, Evi, Musda, Tenri, Ummul, Desi, Irzha, Fahriski, dan Anggelia yang selalu bekerjasama, membantu dan memberikan support kepada penulis dari awal kuliah hingga terselesaikannya tesis ini.
7. Rekan kerja di **PT. Indofood Cbp. Cab Makassar**, terutama **dept. QC** yang telah bekerjasama dan mengorbankan waktunya agar saya dapat mengikuti

perkuliahan dan melaksanakan penelitian hingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini.

8. Sahabat penulis, Marli, Putri, Anas, Claudia, dan Ridha yang selalu mendukung, mendoakan, dan menghibur penulis.
9. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu yang telah memberikan motivasi kepada penulis selama menjalani perkuliahan dan penyelesaian tesis ini.

Akhirnya, segala kerendahan hati, penulis mengharapkan pertimbangan dan masukan dari para pembaca untuk penyempurnaan tulisan ini pada masa yang akan datang. Semoga Allah SWT menjadikan tesis ini bermanfaat bagi pembaca dan berkontribusi nyata terhadap ilmu pengetahuan. Amin yaa rabbal 'aalamin.

Makassar, 08 agustus 2024



Islamuddin Jafar

ABSTRAK

Islamuddin Jafar. “**Karakterisasi dan Uji Aktivitas Antioksidan Hidrolisat Protein Dari Ikan Bandeng (*Chanos chanos*)**” (dibimbing oleh Muhammad Asfar dan Meta Mahendradatta).

Potensi pemanfaatan bandeng untuk memproduksi hidrolisat protein ikan (FPH) sangat besar. FPH dari ikan bandeng memiliki karakteristik bioaktif dan sifat fungsional yang baik, sehingga menjadi produk yang ideal untuk makanan dan suplemen makanan. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menganalisis pengaruh waktu hidrolisis dan penambahan enzim bromelin terhadap karakteristik dan aktivitas antioksidan FPH ikan bandeng. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap pola faktorial dengan variasi waktu hidrolisis (5, 6, dan 7 jam) dan penambahan enzim (5%, 6%, dan 7%). Setiap perlakuan dikombinasikan dan diulang sebanyak tiga kali dan kemudian dianalisis kadar air, kadar lemak, kadar protein terlarut, kadar abu, derajat hidrolisis, berat molekul, rendemen, komposisi asam amino, dan aktivitas antioksidan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi enzim tidak berpengaruh nyata terhadap karakteristik dan aktivitas antioksidan FPH ikan bandeng, sedangkan waktu hidrolisis berpengaruh nyata terhadap karakteristik seperti protein terlarut, derajat hidrolisis dan aktivitas antioksidan FPH ikan bandeng. Perlakuan terbaik berdasarkan efisiensi penggunaan waktu hidrolisis dan penambahan enzim adalah waktu hidrolisis 5 jam dan penambahan enzim 5% yang menghasilkan kadar air 15,31%, kadar abu 5,47%, kadar lemak 0,21%, protein terlarut 42,94%, rendemen 16,84%, derajat hidrolisis 32,04%, berat molekul 10,03-98,80 kDa, dan aktivitas antioksidan IC_{50} 1,43 mg/mL dengan kandungan asam amino esensial yang terdiri dari His, Thr, Val, Met, Phe, Ile, Leu, Arg, Trp, dan Lys serta asam amino non esensial (NAA) yang terdiri dari Cys, Glu, Asp, Ser, Gly, dan Pro.

Kata kunci: Hidrolisis enzimatik, peptida bioaktif, asam amino, pangan fungsional

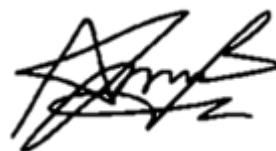
ABSTRACT

Islamuddin Jafar. **Characterization and Antioxidant Activity Analysis of Protein Hydrolysate from Milkfish (*Chanos chanos*)**. Supervised by Muhammad Asfar and Meta Mahendradatta).

The potential of utilizing milkfish to produce fish protein hydrolysate (FPH) is substantial. Milkfish-derived FPH possess excellent bioactive and functional properties, making it an ideal food product and dietary supplements. The purpose of this study was to analyze the effect of hydrolysis time and the addition of bromelain enzyme on the characteristics and antioxidant activity of milkfish FPH. This study applied a complete randomized design with a factorial pattern with variations in hydrolysis time (5, 6, and 7 hours) and enzyme addition (5%, 6%, and 7%). Each treatment was combined and repeated three times and then analyzed for water content, fat content, soluble protein content, ash content, degree of hydrolysis, molecular weight, yield, amino acid composition, and antioxidant activity. The results showed that enzyme concentration did not significantly affect the characteristics and antioxidant activity of milkfish-derived FPH while hydrolysis time significantly affected the FPH's characteristics including soluble protein, degree of hydrolysis and antioxidant activity. The optimal treatment for efficient hydrolysis involves a 5-hours hydrolysis time and a 5% enzyme addition, resulting in moisture content of 15.31%, 5.47% ash content, 0.21% fat content, 42.94% soluble protein, 16.84% yield, degree of hydrolysis 32.04%, molecular weight 10.03-98.80 kDa, and antioxidant activity IC_{50} 1.43 mg/mL with essential amino acid content consisting of His, Thr, Val, Met, Phe, Ile, Leu, Arg, Trp, and Lys and non-essential amino acids (NAAs) consisting of Cys, Glu, Asp, Ser, Gly, and Pro.

Keywords: Enzymatic hydrolysis, bioactive peptides, amino acids, functional foods

Makassar, 05 Juli 2024



Muspirah Djalal

DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN	II
HALAMAN PENGAJUAN	II
HALAMAN PENGESAHAN	III
PERNYATAAN KEASLIAN TESIS	IV
UCAPAN TERIMA KASIH	V
ABSTRAK.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
DAFTAR ISI	IX
DAFTAR GAMBAR	X
DAFTAR TABEL.....	XI
DAFTAR LAMPIRAN.....	XII
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 LATAR BELAKANG.....	1
1.2 RUMUSAN MASALAH.....	2
1.3 TUJUAN PENELITIAN	2
1.4 MANFAAT PENELITIAN	2
BAB II. METODE PENELITIAN.....	3
2.1 ALAT DAN BAHAN	3
2.2 PROSEDUR PENELITIAN	3
2.2.1. PREPARASI SAMPEL.....	3
2.2.2. PEMBUATAN HIDROLISAT PROTEIN IKAN	3
2.3 DESAIN PENELITIAN.....	3
2.4 PARAMETER PENGUJIAN.....	5
2.4.1. KADAR AIR METODE OVEN (AOAC, 2005).....	5
2.4.2. KADAR ABU (AOAC, 2005).....	5
2.4.3. KADAR PROTEIN LARUT METODE LOWRY (WITONO ET AL., 2020).....	5
2.4.4. KADAR LEMAK (AOAC, 2005).....	5
2.4.5. RENDEMEN.....	6
2.4.6. DERAJAT HIDROLISIS (MOHANTY ET AL., 2021).....	6
2.4.7. KOMPOSISI ASAM AMINO METODE HPLC DAN UPLC (AOAC, 2005).....	6
2.4.8. AKTIVITAS ANTIOKSIDAN (TANIYO ET AL, 2021).....	6
2.4.9. PENENTUAN BERAT MOLEKUL SDS-PAGE (WITONO ET AL., 2020)	7
2.5 PENGOLAHAN DATA.....	7
BAB III. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	8
3.1 KADAR AIR.....	8
3.2 KADAR ABU	9
3.3 KADAR LEMAK	10
3.4 RENDEMEN.....	12
3.5 PROTEIN LARUT	13
3.6 DERAJAT HIDROLISIS.....	15
3.7 BERAT MOLEKUL SDS-PAGE.....	16
3.8 KOMPOSISI ASAM AMINO	17
3.9 AKTIVITAS ANTIOKSIDAN	19
BAB IV. PENUTUP	22
4.1 KESIMPULAN.....	22
4.2 SARAN.....	22
DAFTAR PUSTAKA.....	23
LAMPIRAN	28

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1 Diagram alir preparasi daging ikan bandeng	4
Gambar 2 Diagram Pembuatan Hidrolisat Protein Ikan	4
Gambar 3 Hubungan pengaruh konsentrasi enzim dan lama hidrolisis terhadap kadar air HPI bandeng	8
Gambar 4 Hubungan pengaruh konsentrasi enzim dan lama hidrolisis terhadap kadar abu HPI bandeng	9
Gambar 5 Hubungan pengaruh konsentrasi enzim dan lama hidrolisis terhadap kadar lemak HPI bandeng	11
Gambar 6 Hubungan pengaruh konsentrasi enzim dan lama hidrolisis terhadap rendemen HPI bandeng	12
Gambar 7 Hubungan pengaruh konsentrasi enzim dan lama hidrolisis terhadap kadar protein larut HPI bandeng	13
Gambar 8 Hubungan pengaruh konsentrasi enzim dan lama hidrolisis terhadap derajat hidrolisis HPI bandeng	15
Gambar 9 Berat molekul HPI bandeng metode SDS-PAGE	16
Gambar 10 hubungan pengaruh konsentrasi enzim dan lama hidrolisis terhadap aktivitas antioksidan HPI bandeng	20

DAFTAR TABEL

Tabel 1 komposisi Asam Amino HPI Bandeng19

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Data hasil uji statistik kadar air	28
Lampiran 2 Data hasil uji statistik kadar abu	29
Lampiran 3 Data hasil uji statistik kadar lemak	30
Lampiran 4 data hasil uji statistik rendemen HPI bandeng	32
Lampiran 5 data hasil uji statistik protein larut.....	33
Lampiran 6 Data hasil uji statistik Derajat Hidrolisis HPI bandeng	35
Lampiran 7 Data perhitungan dan uji statistik aktivitas antioksidan HPI bandeng.	37
Lampiran 8 Data perhitungan Berat molekul HPI bandeng SDS-PAGE	40
Lampiran 9 Kromatogram dan hasil analisa asam amino	42

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Ikan bandeng (*Chanos chanos*) adalah jenis ikan yang banyak dibudidayakan di Indonesia serta memiliki nilai ekonomis (Aris et al. 2021). Produksi ikan bandeng di Sulawesi Selatan pada tahun 2017 (169.688 ton) hingga 2019 (183.356 ton) merupakan yang tertinggi di Indonesia (BPS, 2019). Ikan bandeng termasuk golongan ikan yang mengandung protein tinggi jika dibandingkan dengan ikan mas, ikan gabus dan ikan lele (Aristiani et al., 2022). Kandungan gizi dalam 100 g daging ikan bandeng yaitu energi sebesar 129 kkal, protein 20 g, kalsium 20 mg, lemak 4,8 g, besi 2 g, fosfor 150 mg, vitamin B1 0,05 mg, dan vitamin A 150 IU (Kemenkes RI, 2023). Besarnya kandungan protein pada ikan bandeng dan jumlah produksi yang tinggi di Sulawesi Selatan dapat dijadikan potensi dalam pemanfaatan ikan bandeng menjadi hidrolisat protein ikan (HPI), yang dapat meningkatkan nilai ekonomis dari ikan bandeng (Dinakarkumar et al., 2022).

HPI adalah hasil dari proses penguraian protein menjadi asam amino ataupun peptida sederhana melalui hidrolisis oleh enzim, asam atau basa (Fitriyani et al., 2021). Kandungan senyawa bioaktif HPI berpotensi untuk diaplikasikan pada makanan ataupun pada industri (Slizyte et al., 2016). Selain itu HPI juga dapat dijadikan suplemen makanan atau dikonsumsi langsung untuk meningkatkan asupan protein (Utomo et al., 2014). HPI memiliki sifat fungsional yang menunjukkan karakteristik bioaktif seperti aktivitas antioksidan, antihipertensi, antimikroba, dan antikanker (Slizyte et al., 2016). Peptida hasil hidrolisis dengan sifat antioksidan sangat penting karena perannya dalam meningkatkan kesehatan manusia melalui pencegahan dan pengobatan penyakit degeneratif kronis tidak menular, seperti penyakit jantung, kanker, arthritis rheumatoid, dan diabetes (Montoya-Rodríguez & de Mejía, 2015). Antioksidan memiliki fungsi untuk menangkal radikal bebas dan menghambat laju oksidasi melalui mekanisme donor atom hidrogen (Bologn, 2014).

Saat ini telah banyak metode yang digunakan untuk memproduksi HPI akan tetapi metode dengan menggunakan enzimatik dianggap lebih baik dikarenakan produk yang dihasilkan tidak banyak kehilangan asam amino dan prosesnya relatif cepat (Utomo et al., 2014). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa penggunaan enzim sangat berperan dalam proses hidrolisat ikan (Wijayanti et al., 2016) mengemukakan konsentrasi enzim bromelin berpengaruh nyata dalam HPI bandeng dengan hasil terbaik pada penambahan enzim 6% pada suhu 55 °C selama 6 jam, begitu pula penelitian sebelumnya dari (Wijayanti et al., 2015) yang menggunakan enzim papain mendapatkan hasil terbaik pada penambahan enzim konsentrasi 5% dengan suhu 55 °C dan waktu hidrolisis 6 jam. Penelitian terkait mengenai hidrolisat protein dari ikan bandeng dengan enzim bromelin yang produk akhirnya berupa cairan, oleh karena itu penelitian ini dilakukan pembuatan HPI bandeng kering yang akan dianalisis lebih lanjut karakteristik dan aktivitas antioksidannya, yang nantinya dapat diaplikasikan dalam pembuatan produk makanan ataupun suplemen makanan.

1.2 Rumusan Masalah

Adapun rumusan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Bagaimana pengaruh konsentrasi enzim terhadap karakteristik dan aktivitas antioksidan produk hidrolisat ikan bandeng?
2. Bagaimana pengaruh waktu hidrolisis terhadap karakteristik dan aktivitas antioksidan produk hidrolisat ikan bandeng?
3. Bagaimana interaksi antara konsentrasi enzim dan waktu hidrolisis terhadap karakteristik dan aktivitas antioksidan hidrolisat ikan bandeng?

1.3 Tujuan penelitian

Adapun tujuan penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Untuk menganalisis pengaruh konsentrasi enzim terhadap karakteristik dan aktivitas antioksidan produk hidrolisat ikan bandeng.
2. Untuk menganalisis pengaruh waktu hidrolisis terhadap karakteristik dan aktivitas antioksidan produk hidrolisat ikan bandeng.
3. Untuk menganalisis interaksi antara konsentrasi enzim dan waktu hidrolisis terhadap karakteristik dan aktivitas antioksidan hidrolisat ikan bandeng.

1.4 Manfaat penelitian

Manfaat penelitian yang diharapkan dari penelitian ini yaitu sebagai sarana informasi untuk masyarakat ataupun industri pangan agar memanfaatkan ikan bandeng yang melimpah di Indonesia terutama Sulawesi Selatan menjadi produk hidrolisat protein tinggi yang baik akan kesehatan serta dapat diaplikasikan langsung terhadap produk pangan.

BAB II. METODE PENELITIAN

2.1 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu: gelas kimia, oven, penangas air, *Erlenmeyer*, pisau, blender, pipet tetes, pH meter, termometer, kertas saring, cawan petri, corong kaca, satu set alat *freeze dryer*, batang pengaduk, tabung *centrifuge*, neraca analitik, furnace, desikator, labu Kjeldahl, satu set alat ekstraksi soxhlet, satu set alat HPLC, satu set alat UPLC, satu set alat Spektrofotometer, satu set alat SDS-PAGE.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu: ikan bandeng segar, enzim bromelin 50.000 U/g, K_2SO_4 , MgO, H_2SO_4 , H_3PO_4 , NaOH, CH_3COOH , HCl, $Na_2S_2O_3$, volin, BSA, $AgNO_3$, BaCl, heksana, kloroform, asam asetat glasial, larutan cuprifosfat, larutan buffer, aquades, larutan deriva, natrium asetat, larutan enchaer ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$), DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil), H_3BO_3 2%, metanol 95%.

2.2 Prosedur penelitian

2.2.1. Preparasi sampel

Ikan bandeng dibersihkan kemudian dipisahkan sisik, tulang, jeroan, dan dagingnya. Daging ikan bandeng yang telah dipisahkan kemudian digiling hingga halus.

2.2.2. Pembuatan Hidrolisat protein ikan

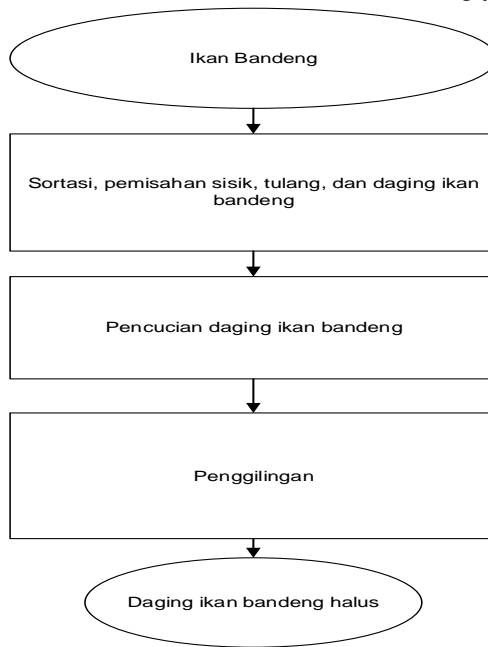
Daging ikan bandeng yang telah dihaluskan dicampur dengan aquades dengan perbandingan (1:2) b/v, selanjutnya ditambahkan enzim bromelin 50.000 U/g dengan konsentrasi (5%, 6%, dan 7%). Kemudian dihidrolisis pada suhu 55 °C dengan menggunakan penangas air selama (5 jam, 6 jam, dan 7 jam). Untuk menjaga kestabilan pH 7 maka pada saat proses berlangsung ditambahkan CH_3COOH sebagai pengatur suasana asam dan NaOH sebagai pengatur suasana basa. Setelah proses hidrolisis selesai kemudian dilakukan pemanasan pada suhu 90 °C selama 20 menit untuk menginaktifkan enzim. Selanjutnya dilakukan penyaringan, dan sentrifugasi pada suhu 4 °C sehingga diperoleh filtrat hidrolisat protein ikan. Filtrat dikeringkan menggunakan alat *freeze dryer* selama 49 jam dengan suhu -50 °C. Bubuk hidrolisat disimpan dalam wadah tertutup.

2.3 Desain penelitian

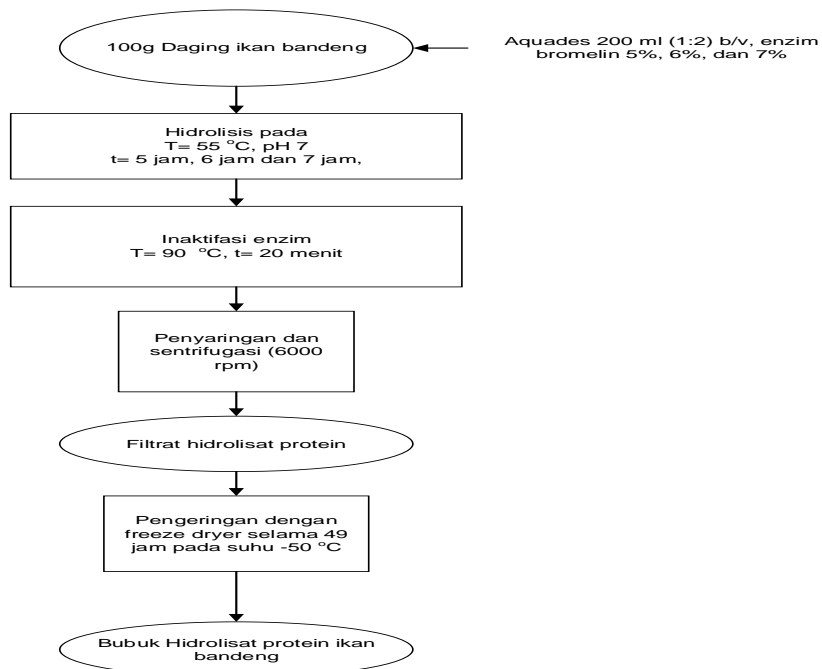
Penelitian ini terdiri dari 2 perlakuan yaitu dengan menggunakan variasi penambahan konsentrasi enzim bromelin (5%, 6%, dan 7%), serta lama proses hidrolisis (5 jam, 6 jam, dan 7 jam), dengan pH 7 dan suhu 55 °C yang terkontrol untuk memperoleh konsentrasi enzim dan waktu optimum dengan rendemen yang memiliki kadar protein yang tinggi.

Konsentrasi enzim dan waktu hidrolisis optimum hidrolisis ditentukan dengan menganalisis karakteristik meliputi pengujian kadar air, kadar lemak, kadar abu,

kadar protein larut, derajat hidrolisis, komposisi asam amino, dan berat molekul metode SDS PAGE, serta aktivitas antioksidan dari HPI bandeng yang diperoleh.



Gambar 1 Diagram alir preparasi daging ikan bandeng



Gambar 2 Diagram Pembuatan Hidrolisat Protein Ikan

2.4 Parameter Pengujian

2.4.1. Kadar Air Metode Oven (AOAC, 2005)

Menimbang sebanyak 1 gram sampel ke dalam cawan yang telah dikeringkan dan diketahui bobotnya. Kemudian sampel dan cawan dikeringkan dalam oven pada suhu 105 °C selama 6 jam. Selanjutnya cawan didinginkan di desikator selama 15 menit dan di timbang, kemudian dikeringkan kembali sampai bobot konstan. Berikut adalah rumus perhitungan kadar air :

$$\text{Kadar air} = \frac{\text{bobot awal (gram)} - \text{bobot akhir (gram)}}{\text{bobot sampel (gram)}} \times 100\%$$

Keterangan :

Bobot Awal = Bobot cawan + sampel sebelum pemanasan

Bobot Akhir = Bobot cawan + sampel setelah pemanasan

2.4.2. Kadar Abu (AOAC, 2005)

Pengujian kadar abu dilakukan dengan menimbang sampel sebanyak 1 gram ke dalam cawan porselin yang telah di oven selama 1 jam pada suhu 105 °C. selanjutnya sampel dimasukkan ke dalam furnish dengan suhu 400-600 °C selama 3 jam hingga diperoleh abu yang keputih-putihan. Kemudian cawan berisi sampel dimasukkan ke dalam desikator selama 15 menit. Kemudian ditimbang. Kadar abu dihitung dengan rumus:

$$\text{Kadar Abu (\%)} = \frac{\text{berat abu}}{\text{berat sampel}} \times 100$$

2.4.3. Kadar Protein Larut Metode Lowry (Witono et al., 2020)

Sampel hidrolisat protein ikan sebanyak 0,1 gram dilarutkan dalam 100 mL aquades. Selanjutnya larutan sampel dipipet sebanyak 1 ml dan di tambahkan aquades hingga volume 2 ml. Larutan sampel hasil pengenceran dipipet sebanyak 0.5 ml kemudian ditambahkan aquades sebanyak 1,5 ml, ditambahkan lagi dengan *reagen Lowry* sebanyak 2,75 ml dan di inkubasi selama 15 menit. Setelah inkubasi itu larutan kembali ditambahkan dengan 0.25 ml volin dan divortex. Selanjutnya didiamkan selama 30 menit lalu dilakukan pengukuran absorbansi dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang (λ) 650 nm.

2.4.4. Kadar Lemak (AOAC, 2005)

Kadar lemak dihitung dengan menggunakan metode soxhlet. Sampel ditimbang sebanyak 2 gram, kemudian dimasukkan kedalam thimble. Thimble dimasukkan kedalam soxhlet yang telah diketahui bobotnya. kemudian ditambahkan sebanyak 150 ml pelarut kloroform. Ekstraksi dilakukan selama \pm 8 jam dengan suhu 60°C. Lemak yang telah diekstraksi dalam labu kemudian dipanaskan dalam oven selama 1 jam suhu 105°C. labu didinginkan dalam desikator selama 15 menit kemudian ditimbang hingga diperoleh bobot tetap. Kadar lemak dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\text{Kadar lemak (\%)} = \frac{w_3 - w_1}{w_1} \times 100$$

Keterangan:

W1 = bobot sampel (gram)

W2 = bobot labu lemak kosong (gram)

W3 = bobot labu lemak + lemak hasil ekstraksi (gram)

2.4.5. Rendemen

Rendemen adalah produk hasil yang diperoleh dari sejumlah bahan baku yang digunakan. Rendemen ditentukan dengan membagi berat produk akhir (B2) dengan bahan baku (B1).

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{B_2}{B_1} \times 100$$

2.4.6. Derajat Hidrolisis (Mohanty et al., 2021)

Sebanyak 20 mg hidrolisat protein ditambahkan 20 ml TCA 10 % (b/v). didiamkan selama 30 menit kemudian disentrifugasi pada 7800 rpm selama 15 menit. Supernatan yang diperoleh dianalisis kadar nitrogennya menggunakan metode Kjeldahl, (Witono et al., 2020). derajat hidrolisis dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\text{Derajat hidrolisis (\%)} = \frac{\text{Nitrogen terlarut dalam TCA}}{\text{Nitrogen total sampel}} \times 100$$

2.4.7. Komposisi Asam Amino metode HPLC dan UPLC (AOAC, 2005)

Membuat minimal 6 titik konsentrasi deret standar asam amino. Timbang 0.1-1 g porsi uji dan masukkan ke dalam vial headspace 20 mL, kemudian tambahkan larutan NaOH 4.2 M. Hidrolisis larutan pada suhu 110 °C selama 20 jam, lalu pindahkan ke dalam gelas piala 50 mL. Tambahkan larutan buffer sitrat dan atur pH larutan hingga pH 4.25 dengan larutan HCl atau NaOH. Tambahkan akuabides hingga tanda tera dan homogenkan. Pindahkan larutan sampel ke dalam tube 2 mL dan sentrifugasi. Pindahkan larutan uji secara kuantitatif ke dalam labu ukur 50 mL, saring supernatan dengan syringe filter 0.45 µm ke dalam vial 2 mL, kemudian injeksikan ke dalam sistem HPLC.

Menyiapkan 1 titik konsentrasi standar asam amino disertai internal standar. Timbang 0.1-1 g porsi uji ke dalam wadah yang sesuai, lalu hidrolisis dengan larutan HCl. Pindahkan hasil hidrolisis ke dalam labu ukur 50 mL dan saring larutan uji dengan syringe filter 0.2 µm, tampung filtrat. Tambahkan internal standar dan akuabides hingga tanda tera, lalu homogenkan. Lanjutkan ke tahap derivatisasi dan injeksikan larutan ke dalam sistem UPLC.

2.4.8. Aktivitas antioksidan (Taniyo et al, 2021)

Aktivitas antioksidan hidrolisat protein dalam menghambat radikal DPPH dinyatakan sebagai persen peredaman (inhibisi). Larutan DPPH dibuat dengan

melarutkan 4 mg kristal DH kedalam 100 ml methanol. Selanjutnya sampel dibuat dalam berbagai konsentrasi 500, 600, 700, 800, 900, dan 1000 ppm. Masing- masing sampel dipipet sebanyak 2 ml dan direaksikan dengan 2 ml DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil), campuran kemudian di vortex dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 30 menit. Kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-VIS dengan panjang gelombang 517 nm. Aktivitas antioksidan dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\text{Inhibisi (\%)} = \frac{\text{absorbansi blanko} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi blanko}} \times 100$$

Hasil perhitungan persen (%) inhibisi dimasukkan dalam persamaan regresi linear :

$$y = a x + b$$

Dimana:

y = % inhibisi

a = Gradien

x = Konsentrasi

b = Konstanta

Persamaan linear digunakan untuk memperoleh nilai IC_{50} . Nilai IC_{50} merupakan konsentrasi yang diperoleh pada saat % inhibisi sebesar 50 dari persamaan $y = ax + b$. Pada saat % Inhibisi = 50, maka untuk menghitung nilai IC_{50} persamaannya menjadi: $50 = ax + b$. sehingga $x = \frac{50 - b}{a}$. Nilai x adalah IC_{50} .

2.4.9. Penentuan Berat Molekul SDS-PAGE (Witono et al., 2020)

Penentuan berat molekul menggunakan metode SDS PAGE (*Sodium Dodecil Sulphate polyamide Gel Electrophoresis*). Gel yang digunakan ada 2 jenis yaitu gel pemisah 12.5 %, dan gel penahan 4%. Kemudian dilakukan pewarnaan dengan silver staining yaitu: merendam gel dalam larutan fiksasi (metanol 25 % dan asam asetat 12 %) selama 1 jam dan direndam dalam etanol 50 % selama 20 menit kemudian direndam lagi dengan etanol 30% selama 20 menit dilakukan sebanyak 2 kali, kemudian larutan diganti dengan larutan enchaer ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$) selama 1 menit. selanjutnya dicuci dengan aquades, lalu ditambahkan silver nitrat diamkan 30 menit. Kemudian cuci dengan aquades 40 detik selanjutnya tambahkan larutan developer (campuran Na_2CO_3 dan formaldehida) dan terakhir dengan larutan fiksasi.

2.5 Pengolahan Data

Penelitian ini disusun menggunakan RAL (Rancangan Acak Lengkap) pola faktorial dengan ulangan sebanyak tiga kali, jika perlakuan berpengaruh nyata dilanjutkan dengan uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf kepercayaan 95%.