

**HIDROLISIS PROTEIN DARI DAGING IKAN SIDAT (*Anguilla marmorata*) SECARA ENZIMATIK MENGGUNAKAN EKSTRAK BROMELIN DARI BUAH NANAS DAN UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN**

*ENZYMATIC HYDROLYSIS OF MEAT PROTEIN FROM THE GIANT MOTTLED EEL (*Anguilla marmorata*) USING BROMELAIN EXTRACT FROM PINEAPPLE FRUIT AND ANTIOXIDANT ACTIVITY TEST*

**JUMARDI**

**H012201007**



**PROGRAM STUDI MAGISTER KIMIA**

**PROGRAM PASCASARJANA**

**UNIVERSITAS HASANUDDIN**

**MAKASSAR**

**2023**

**HIDROLISIS PROTEIN DARI DAGING IKAN SIDAT (*Anguilla marmorata*) SECARA ENZIMATIK MENGGUNAKAN EKSTRAK BROMELIN DARI BUAH NANAS DAN UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN**

Tesis

sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar magister

Program Studi Magister Kimia

Disusun dan diajukan oleh

JUMARDI

H012201007

kepada

**PROGRAM MAGISTER KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2023**

**TESIS**

**HIDROLISIS PROTEIN DARI DAGING IKAN SIDAT (*Anguilla marmorata*)  
SECARA ENZIMATIK MENGGUNAKAN EKSTRAK BROMELIN DARI  
BUAH NANAS DAN UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN**

**JUMARDI**

**NIM: H012201007**

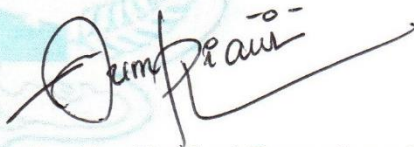
Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam  
rangka Penyelesaian Studi Program Magister Kimia Fakultas Matematika  
dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin  
pada tanggal 10 Februari 2023  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

**Menyetujui**

**Pembimbing Utama**

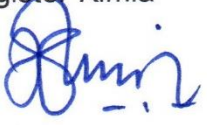
**Pembimbing Pendamping**



  
Dr. Rugaiyah A. Arfah, M.Si  
NIP. 196112311987022002

  
Dr. Nur Umriani Permatasari, M.Si  
NIP. 198112092006042003

**Ketua Program Studi  
Magister Kimia**

**Dekan Fakultas MIPA  
Universitas Hasanuddin**

  
Dr. Hasnah Natsir, M.Si  
NIP. 196203201987112001

  
  
Dr. Eng. Amiruddin, M.Si  
NIP. 197205151997021002

## PERNYATAAN KEASLIAN TESIS DAN KELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa, tesis berjudul "*Hidrolisis Protein dari Daging Ikan Sidat (Anguilla marmorata) Secara Enzimatik Menggunakan Ekstrak Bromelin dari Buah Nanas dan Uji Aktivitas Antioksidan*" adalah benar karya saya dengan arahan dari komisi pembimbing (Dr. Rugaiyah A. Arfah, M.Si sebagai Pembimbing Utama dan Dr. Nur Umriani Permatasari, M.Si sebagai Pembimbing Pertama). Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apapun kepada perguruan tinggi manapun. 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. Sebagian dari isi tesis ini telah dipublikasikan di *AIP Conferences Proceeding* sebagai aritkel dengan judul "*Optimization of the protein hydrolysates production from the giant mottled eel (Anguilla marmorata) meat protein using bromelain extract*".

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

Makassar, 20 Februari 2023



Jumardi

NIM: H012201007

## UCAPAN TERIMA KASIH

Bismillahirrahmananirrahim, segala puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT karena berkat rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis dengan judul "**Hidrolisis Protein dari Daging Ikan Sidat (*Anguilla marmorata*) Secara Enzimatik Menggunakan Ekstrak Bromelin dari Buah Nanas dan Uji Aktivitas Antioksidan**".

Shalawat dan salam tak lupa tercurahkan kepada Baginda Rasulullah SAW, kepada keluarganya, para sahabatnya, dan kepada umatnya hingga akhir zaman. Penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada pihak-pihak yang telah membantu dalam proses penulisan tesis ini, terutama terima kasih kepada kedua orang tua, ayahanda Muhlis (Alm) yang wafat diakhir-akhir masa studi magister saya dan ibunda Norma terima kasih untuk setiap semangat, bantuan, kasih sayang dan doa yang senantiasa tak henti-hentinya diberikan kepada saya, semoga Allah senantiasa memberikan rahmat berupa kasih sayang, keteguhan hati di atas agama Allah, dan kemuliaan bukan hanya di dunia tapi juga di akhirat Insya Allah. Terima kasih juga kepada saudara-saudara saya Lisnawati, Herlina, dan Abdul Haris yang selalu memberikan motivasi untuk saya, serta menjadi penyemangat bagi saya, semoga Allah senantiasa melindungi mereka di jalan kebenaran, Aamiin.

Ucapan terima kasih dan penghargaan penulis sampaikan kepada seluruh pihak yang membantu dalam proses penyelesaian tesis ini, terutama kepada ibunda Dr. Rugaiyah A. Arfah, M.Si dan ibunda Dr. Nur Umriani Permatasari, M.Si selaku pembimbing utama dan pertama yang senantiasa meluangkan waktu, tenaga dan pikirannya dalam membimbing dan memberikan arahan yang baik, terutama dalam menyelesaikan penelitian dan tesis ini.

Penulis juga tak lupa mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang sebesar-besarnya kepada:

1. Dr. Hasnah Natsir, M.Si, selaku ketua program studi S2 Ilmu Kimia Universitas Hasanuddin, beserta dosen dan staf yang telah membantu penulis dalam perjalanan menyelesaikan pendidikan ini.
2. Dosen penguji ujian, yaitu Prof. Ahyar Ahmad, Ph.D, Prof. Dr. Nunuk Hariani Soekamto, M.S, dan Prof. Abdul Wahid Wahab, M.Sc.
3. Almarhum Dr. Firdaus Zenta, M.S dan Almarhumah Dr. Nursiah La Nafie, M.Sc

selaku penguji 2 dan penguji 3 yang wafat pada masa proses penyelesaian studi magister ini. Semoga Allah memberikan rahmat, mengampuni dosa-dosanya dan memasukkan mereka kedalam surga firdaus-Nya.

4. Mahdalia, S.Si, M.Si, selaku analis Laboratorium Biokimia atas bantuan serta arahannya selama penelitian berlangsung.
5. Rekan partner peneliti biokimia Mira, Nur, Inal Besse, Ade dan Aisyah. Terima kasih atas semangat, ilmu dan motivasinya selama bekerja di Laboratorium Biokimia.
6. Teman-teman Angkatan 2020 Ganjil, terima kasih atas semangat, dukungan selama menempuh Pendidikan magister.
7. Mahasiswa peneliti yang menjadi tempat bertanya dan diskusi selama proses penelitian berlangsung sampai terselesaikannya Tesis ini.
8. Rekan Kerja di SMAS Tahfizhul Quran Imam Asy-Syathiby Gowa, atas kesempatan, doa, dukungan dan motivasi yang senantiasa diberikan selama menempuh studi magister Kimia.
9. Semua pihak yang telah banyak membantu penulis selama menyelesaikan penelitian, terima kasih.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan tesis masih terdapat kekurangan yang perlu dilengkapi. Oleh karena itu, dengan rendah hati penulis mengharapkan masukan, koreksi dan saran untuk melengkapi kekurangan tersebut.

Makassar, Februari 2023

Penulis

## ABSTRAK

JUMARDI. Hidrolisis protein dari daging ikan sidat (*Anguilla marmorata*) secara enzimatis menggunakan ekstrak bromelin dari buah nanas dan uji aktivitas antioksidan (dibimbing oleh Rugaiyah A. Arfah dan Nur Umriani Permatasari).

Ikan sidat *Anguilla marmorata* merupakan salah satu spesies ikan yang memiliki kandungan protein yang tinggi sehingga berpotensi sebagai sumber senyawa peptida bioaktif. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan kondisi optimum hidrolisis protein dari ikan sidat *A. marmorata* menggunakan enzim bromelin yang diekstrak dari buah nanas serta untuk mengetahui aktivitas antioksidan dari masing-masing hidrolisat protein. Tahapan penelitian ini meliputi isolasi enzim bromelin, optimasi parameter hidrolisis protein (pH, suhu waktu dan konsentrasi enzim), ultrafiltrasi, dan pengujian aktivitas antioksidan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kondisi optimum hidrolisis protein yaitu pada pH 8 dengan suhu pemanasan 60°C selama 2 jam serta konsentrasi enzim bromelin 3%. Pada kondisi tersebut diperoleh derajat hidrolisis (DH) tertinggi sebesar 61,3%. Hasil uji aktivitas antioksidan menggunakan DPPH dan kekuatan mereduksi Fe<sup>3+</sup> pada 20 hidrolisat protein diperoleh bahwa pada perlakuan pH 5 menunjukkan aktivitas antioksidan tertinggi terhadap DPPH dengan capaian persen inhibisi 80,1% dan kemampuan mereduksi Fe<sup>3+</sup> tertinggi 9,1 mg AA/g HP. Selanjutnya dilakukan pemisahan dengan berat molekul > 10 kDa, 10-5 kDa, 5-3 kDa, dan <3 kDa. Hasil diperoleh menunjukkan bahwa fraksi peptida 10-5 kDa memiliki aktivitas inhibisi terhadap DPPH dengan nilai IC<sub>50</sub> 0,418 mg/mL kemampuan mereduksi terhadap Fe<sup>3+</sup> sebesar 7,9 mg AA/g HP dengan EC<sub>50</sub> = 15,59 mg/mL. Berdasarkan nilai IC<sub>50</sub> dan EC<sub>50</sub> yang diperoleh menunjukkan bahwa hidrolisat protein dari ikan sidat *A. marmorata* berpotensi sebagai sumber senyawa antioksidan peptida bioaktif.

Kata Kunci: *A. marmorata*, antioksidan, bromelin, hidrolisis enzimatis, optimasi

## ABSTRACT

JUMARDI. enzymatic hydrolysis of meat protein from the giant mottled eel (*Anguilla marmorata*) using bromelain extract from pineapple fruit and antioxidant activity test (supervised by Rugaiyah A. Arfah dan Nur Umriani Permatasari).

The eel *Anguilla marmorata* is one of the fish species that contain high protein, thus it has the potential as a source of bioactive peptide compounds. This study aimed to determine the optimum conditions for protein hydrolysis of eel *A. marmorata* using the enzyme bromelain extracted from pineapple and to determine the antioxidant activity of each protein hydrolyzate. The stages of this study include the isolation of the bromelain enzyme, optimization of protein hydrolysis parameters (pH, time temperature, and enzyme concentration), ultrafiltration, and antioxidant activity testing. The results showed that the optimum conditions for protein hydrolysis are at pH 8 with a heating temperature of 60°C for 2 hours and a concentration of bromelain enzyme of 3%. In these conditions, the highest degree of hydrolysis (DH) of 61.3% was obtained. The results of an antioxidant activity test using DPPH and the reducing power of Fe<sup>3+</sup> on 20 protein hydrolysates showed that the pH-5 treatment showed the highest antioxidant activity against DPPH with a percent inhibition of 80.1% and the highest reducing ability of Fe<sup>3+</sup> of 9.1 mg AA/g HP. Furthermore, separation with molecular weights > 10 kDa, 10-5 kDa, 5-3 kDa, dan <3 kDa. The results showed that peptides fraction with molecular weights 10-5 kDa have inhibitory activity against DPPH with an IC<sub>50</sub> value of 0.418 mg/mL and the ability to reduce Fe<sup>3+</sup> to 7,9 mg AA/G HP with an EC<sub>50</sub> of 15.59 mg/mL. The protein hydrolysate from Eel *A. marmorata* has potential as a source of bioactive peptide antioxidant compounds based on the IC<sub>50</sub> and EC<sub>50</sub> values obtained.

Keywords: *A. marmorata*, antioxidant, bromelain, enzymatic hydrolysis, optimization



## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
UCAPAN TERIMA KASIH .....	iv
ABSTRAK.....	vi
ABSTRACT.....	vii
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR .....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
DAFTAR SINGKATAN .....	xv
BAB I PENDAHULUAN .....	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Manfaat Penelitian .....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 Stres Oksidatif dan Antioksidan.....	6
2.2 Peptida Bioaktif .....	7
2.3 Peptida Antioksidan .....	8
2.4 Ikan Sidat ( <i>Anguilla</i> spp.) .....	9
2.4.1 Gambaran Umum .....	9
2.4.2 Distribusi .....	10
2.4.3 Komposisi Kimia .....	10
2.5 Protein dan Asam Amino .....	11
2.6 Hidrolisis Protein .....	14

2.7 Hidrolisis Enzimatik .....	15
2.8 Bromelin .....	16
2.9 Uji Antioksidan.....	17
2.10..Instrumen .....	19
2.10.1 Sentrifugasi.....	19
2.10.2 Spektrofotometer .....	19
2.11 Kerangka Pikir.....	20
2.12 Hipotesis .....	22
<b>BAB III METODE PENELITIAN .....</b>	<b>23</b>
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	23
3.2 Alat dan Bahan.....	23
3.2.1 Alat Penelitian .....	23
3.2.2 Bahan Penelitian .....	23
3.3 Prosedur Kerja .....	24
3.3.1 Isolasi dan Pemurnian Parsial Enzim Bromelin .....	24
3.3.2 Penentuan Kadar Protein Ekstrak Kasar Enzim Bromelin dan Protein Ikan Sidat.....	26
3.3.3 Penentuan Aktivitas Ekstrak Enzim Bromelin .....	27
3.3.4 Preparasi Sampel Ikan Sidat ( <i>Anguilla marmorata</i> ).....	28
3.3.5 Analisis Proksimat Daging Ikan Sidat.....	29
3.3.6 Penetapan Kadar Asam Amino Protein Ikan Sidat Menggunakan UPLC .....	31
3.3.7 Optimasi Proses Hidrolisis Protein dari Daging Ikan Sidat Menggunakan Ekstrak Enzim Bromelin .....	31
3.3.8 Penentuan Derajat Hidrolisis .....	34
3.3.9 Ultrafiltrasi .....	34
3.3.10 Penentuan Aktivitas Antioksidan Hidrolisat Protein dengan metode DPPH.....	35

3.3.11 Penentuan Aktivitas Kekuatan Mereduksi Hidrolisat Protein Dengan Metode Kekuatan Mereduksi ( <i>Reducing Power</i> ).....	36
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN .....	37
4.1 Isolasi dan Pemurnian Parsial Enzim Bromelin dari Buah Nanas .....	37
4.2 Komposisi Kimia Daging Ikan Sidat <i>A. marmorata</i> .....	40
4.3 Optimasi proses hidrolisis protein ikan sidat <i>A. marmorata</i> .....	42
4.3.1 Pengaruh pH terhadap derajat hidrolisis .....	42
4.3.2. Pengaruh suhu terhadap derajat hidrolisis.....	43
4.3.3 Pengaruh waktu hidrolisis terhadap derajat hidrolisis.....	44
4.3.4 Pengaruh konsentrasi enzim terhadap derajat hidrolisis .....	45
4.4 Aktivitas Antioksidan Hidrolisat Protein Ikan Sidat.....	46
4.4.1 Metode DPPH .....	46
4.4.2 Metode <i>Reducing Power</i> .....	49
4.4.3 Ultrafiltrasi menggunakan membran MWCO .....	51
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN .....	55
5.1 Kesimpulan.....	55
5.2 Saran .....	55
DAFTAR PUSTAKA .....	56
LAMPIRAN .....	67

**DAFTAR TABEL**

<b>Nomor</b>		<b>Halaman</b>
1.	Asam-asam amino penyusun protein .....	12
2.	Jenis-jenis enzim protease .....	15
3.	Jenis-jenis enzim protease pada nanas .....	17
4.	Aktivitas proteolitik hasil fraksinasi dan dialisis enzim bromelin.....	38
5.	Analisis proksimat ikan sidat <i>A. marmorata</i> .....	40
6.	Komposisi asam amino pada ikan sidat <i>A. marmorata</i> .....	41
7.	Kadar protein fraksi peptida hasil ultrafiltrasi.....	51
8.	Aktivitas antioksidan fraksi peptida hasil ultrafiltrasi.....	52
9.	Peptida antioksidan dari beberapa spesies ikan .....	53

## DAFTAR GAMBAR

Nomor	Halaman
1. Ikan sidat <i>Anguilla marmorata</i> .....	9
2. Struktur kimia EPA dan DHA .....	10
3. (a) struktur dasar asam amino, (b) contoh ikatan peptida pada pentapeptida.....	11
4. Mekanisme reaksi pengujian DPPH .....	18
5. Mekanisme reaksi kekuatan mereduksi.....	18
6. Skema kerja spektrofotometer .....	20
7. Kerangka pikir penelitian .....	21
8. Pengaruh pH terhadap derajat hidrolisis .....	42
9. Pengaruh suhu terhadap derajat hidrolisis .....	43
10. Pengaruh waktu hidrolisis terhadap derajat hidrolisis .....	44
11. Pengaruh konsentrasi enzim terhadap derajat hidrolisis.....	45
12. Mekanisme reaksi peptida antioksidan.....	46
13. Aktivitas inhibisi hidrolisat protein ikan sidat <i>A. marmorata</i> terhadap DPPH .....	47
14. Mekanisme reduksi Fe <sup>3+</sup> menjadi Fe <sup>2+</sup> oleh tirosin.....	49
15. Aktivitas kekuatan mereduksi Fe <sup>3+</sup> 20 hidrolisat protein ikan sidat <i>A. marmorata</i> .....	50

## DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Halaman
1. Tahapan Penelitian.....	67
2. Skema kerja isolasi ekstrak enzim bromelin .....	68
3. Skema kerja pemurnian parsial ekstrak enzim bromelin .....	69
4. Skema kerja penentuan aktivitas bromelin terhadap kasein .....	70
5. Skema kerja preparasi ikan sidat .....	71
6. Skema kerja penentuan pH optimum hidrolisis protein ikan sidat.....	72
7. Skema kerja penentuan suhu optimum hidrolisis protein ikan sidat.....	73
8. Skema kerja penentuan waktu hidrolisis optimum protein ikan sidat.....	74
9. Skema kerja penentuan konsentrasi enzim optimum hidrolisis protein ikan sidat.....	75
10. Skema kerja ultrafiltrasi hidrolisat protein ikan sidat.....	76
11. Skema kerja penentuan aktivitas antioksidan hidrolisat protein dengan metode DPPH .....	77
12. Skema kerja Pengujian kekuatan mereduksi Fe <sup>3+</sup> hidrolisat protein dan peptida .....	78
13. Penentuan kadar protein .....	79
14. Penentuan aktivitas katalitik enzim bromelin .....	80
15. Data hasil analisis proksimat pada sampel ikan sidat <i>A. marmorata</i> ....	82
16. Data hasil analisis asam-asam amino pada sampel ikan sidat <i>A. marmorata</i> .....	83
17. Data perhitungan derajat hidrolisis.....	84
18. Pengujian antioksidan dengan DPPH .....	86
19. Pengujian kekuatan mereduksi Fe <sup>3+</sup> hidrolisat protein .....	87
20. Kadar protein hasil ultrafiltrasi .....	89

21. Pengujian antioksidan dengan DPPH dan kekuatan mereduksi Fe <sup>3+</sup> peptida hasil ultrafiltrasi .....	90
22. Dokumentasi Penelitian.....	94

## DAFTAR ARTI LAMBANG/SINGKATAN

Lambang/singkatan	Arti dan keterangan
BSA	<i>Bovine serum Albumin</i>
kDa	satuan berat molekul, Dalton
DHA	<i>Docosahexaenoic acid</i>
dkk	dan kawan-kawan
DPPH	<i>α- diphenyl-β-picrylhydrazyl</i>
EC	<i>Enzyme commission</i>
EPA	<i>Eicosapentaenoic acid</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
g	Satuan bobot gram
KKP	Kementerian Kelautan dan Perikanan
IC <sub>50</sub>	<i>Inhibitory concentration</i>
n-3 PUFA	<i>N-3 polyunsaturated fatty acids</i>
ppm	<i>Part per million</i> , bagian per juta
TCA	Asam trikloroasetat
UV-Vis	<i>Ultraviolet visible</i>
WoRMS	<i>World Register of Marine Species</i>
BM	Berat molekul
µg/mL	satuan mikrogram/mililiter
U/mL	Unit per milliliter
µL	Satuan volume, mikroliter
mg AA/g HP	Milligram asam askorbat per gram hidrolisat protein



# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Radikal bebas (*free radical*) adalah molekul atau senyawa yang mengandung satu atau lebih elektron tidak berpasangan sehingga bersifat reaktif. Radikal bebas dapat bersumber dari hasil antara (*intermediate*) pada proses metabolisme pada tubuh (Di Meo dan Venditti, 2020; George dan Abrahamse, 2020). Namun, radikal bebas yang dihasilkan akan distabilkan oleh antioksidan yang ada di dalam tubuh (Griñan-Lison dkk., 2021). Selain dari dalam tubuh, radikal bebas juga bersumber dari luar tubuh seperti paparan sinar matahari, makanan, dan polusi lingkungan (Sharifi-Rad dkk., 2020). Ketidakseimbangan (*imbalance*) antara produksi radikal bebas dengan antioksidan akan menyebabkan stres oksidatif (Tan dkk., 2018; Touyz dkk., 2020). Stres oksidatif memiliki peran penting terhadap munculnya penyakit-penyakit kronis seperti penyakit kardiovaskular, kanker, diabetes melitus, hipertensi dan penyakit neurodegeneratif (Burgos-Morón dkk., 2019; Haider dkk., 2020).

Salah satu upaya yang dapat dilakukan untuk mencegah stres oksidatif adalah dengan mengonsumsi makanan atau suplemen yang mengandung antioksidan seperti vitamin A, vitamin C, vitamin E, likopen dan nutrisi lainnya seperti protein, dan peptida. Beberapa dekade terakhir, telah terjadi trend penelitian ilmiah tentang peptida bioaktif yang menunjukkan cakupan fungsi yang luas selain sebagai sumber nutrisi seperti antioksidan, imunomodulator, antihipertensi, khelasi logam, antikanker, antimikroba, dan antitrombotik (Akbarian dkk., 2022; Jakubczyk dkk., 2020). Sehingga penelitian peptida bioaktif terus mengalami perkembangan yang pesat karena cakupan bioaktivitasnya yang luas dan cocok untuk diterapkan sebagai komponen makanan atau suplemen makanan (Zhao dkk., 2019). Peptida bioaktif umumnya diperoleh dari hasil hidrolisis protein. Protein dapat diperoleh dari tumbuhan maupun dari hewan. Ikan merupakan salah satu sumber protein, peptida dan asam amino yang baik. Kandungan protein pada ikan berkisar 18 - 50% (Craig, 2017).

Peptida bioaktif dari ikan memiliki aktivitas antioksidan (Abuine dkk., 2019; Wang dkk., 2017) yang dapat mencegah stres oksidatif penyebab munculnya penyakit kronis (Cicero dkk., 2017). Penelitian yang telah dilakukan oleh Abebe dkk. (2020), bahwa hidrolisis protein ikan sidat *A. japonica* menggunakan enzim alkalase berpotensi sebagai bahan makanan fungsional. Hidrolisat protein memiliki aktivitas antioksidan terhadap *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl* (DPPH) tertinggi dengan  $IC_{50} = 3,02$  mg/mL dan inhibitor ACE dengan  $IC_{50} = 110,37$  g/mL. Komposisi asam amino tertinggi pada daging ikan yaitu glisin (23,98%) dan alanin (12,83%).

Penelitian isolasi peptida bioaktif juga telah dilakukan Takahashi dkk. (2021), hidrolisis protein ikan Salmon *Oncorhynchus keta* menggunakan *Protease P "Amano" 3SD* dari *Aspergillus melleus* diperoleh peptida Val-Pro-Ile (BM= 328,2218 Da) dan Ile-Pro-Ile (BM= 342,2389 Da) memiliki aktivitas inhibitor terhadap *Dipeptidyl peptidase-IV* (DPP-IV) dengan  $IC_{50} = 1,0$  µg/mL. Sehingga berpotensi sebagai makanan fungsional untuk pengobatan diabetes tipe II. Penelitian yang dilakukan Tkaczewska dkk. (2019), hidrolisis protein dari gelatin ikan karper *Cyprinus carpio* menggunakan *protamex®* diperoleh dipeptida Ala-Tyr (BM= 252,27 Da) dengan aktivitas antioksidan 23,76% terhadap DPPH. Kandungan asam amino hidrolisat protein tertinggi yaitu glisin (28,12%) dan prolin (13,60%).

Ikan sidat (*Anguilla* spp.) merupakan jenis ikan yang banyak dijumpai di daerah tropis dan subtropis (Yi-Cheng dkk., 2020). Tercatat ada 20 spesies ikan sidat di dunia (Froese dan Pauly, 2021) dan 10 diantaranya ditemukan di Indonesia (Suryati, 2018). Namun, budidaya ikan sidat masih perlu dikembangkan oleh masyarakat sehingga Kementerian Kelautan dan Perikanan (KKP) telah berupaya untuk mendorong masyarakat untuk meningkatkan budidaya ikan tersebut karena memiliki harga yang cukup tinggi di pasaran global (KKP, 2020). Upaya untuk mendorong budidaya ikan sidat dapat dilakukan dengan mengembangkan produk-produk olahan dari ikan sidat menjadi nutrasetikal dan makanan fungsional.

Ikan sidat mengandung protein berkisar 16%-20%. Berdasarkan penelitian yang dilakukan Nafsiyah dkk.(2018), protein ikan sidat *A. marmorata* berkisar 17,30 % dan ikan sidat *A. bicolor bicolor* berkisar 16,78%. Penelitian yang lain, Huyen dan Linh (2020), protein ikan sidat *A. marmorata* sebesar 19,54 % dan ikan sidat *A. bicolor bicolor* berkisar 16,78%. Profil asam-asam amino pada ikan sidat *A. marmorata* telah dilakukan Jamaluddin dkk. (2019), ditemukan 9 jenis asam

amino esensial (isoleusin, leusin, lisin, tirosin, fenilalanin, treonin, triptofan, valin, dan histidin) dan 9 jenis asam amino non esensial (sistein, serin, arginin, glisin, asam aspartat, asam glutamat, alanin, prolin). Memiliki rasa yang gurih serta aman bagi orang islam dari segi kehalalan. Sehingga ikan sidat berpotensi sebagai sumber peptida bioaktif.

Pembuatan peptida bioaktif dapat dilakukan dengan menghidrolisis protein secara enzimatik dan secara kimiawi (Tapal dan Tikun, 2018). Secara enzimatik dapat dilakukan melalui fermentasi menggunakan mikroba penghasil enzim protease atau penambahan enzim protease seperti pepsin, tripsin, papain, dan bromelin (Mora dkk., 2018). Sedangkan pada proses kimiawi, hidrolisis protein dilakukan dengan penambahan asam atau alkali (Das dkk., 2021). Dibandingkan dengan hidrolisis kimiawi, hidrolisis enzimatik lebih menguntungkan karena protease bekerja secara spesifik, lebih aman, dan mudah deaktivasi setelah proses hidrolisis. Tetapi enzim komersial sangat mahal (Hou dkk., 2017). Untuk mengatasi hal tersebut, pembuatan pangan nutrasetikal atau makanan fungsional dapat menggunakan enzim yang diisolasi dari tanaman seperti bromelin dari nanas.

Bromelin merupakan enzim protease yang diisolasi dari nanas (*Ananas comosus* L.). Bromelin termasuk enzim endopeptidase yang memotong rantai peptida bagian dalam sehingga produk hidrolisis protein yang dihasilkan berupa oligopeptida dan peptida (Dhillon dkk., 2016). Bromelin terbagi atas dua yaitu bromelin batang (EC 3.4.22.32) dan bromelin buah (EC 3.4.22.33). Dari kedua sumber tersebut, bromelin buah memiliki aktivitas proteolitik yang lebih tinggi dan spesifisitas yang lebih besar dibandingkan dengan bromelin batang (Singh dkk., 2019). Selain itu, buah nanas sebagai sumber bromelin buah lebih baik dan cocok digunakan dalam bidang pangan seperti nutrasetikal dan makanan fungsional serta mudah ditemukan.

Penelitian yang dilakukan Cheng dkk. (2020), hidrolisis daging ikan sidat *Anguilla marmorata* menggunakan enzim alkalase, bromelin dan papain menunjukkan bahwa derajat hidrolisis (DH) terendah dengan DH berkisar 10% pada hidrolisis menggunakan enzim bromelin tetapi memiliki aktivitas antioksidan tertinggi terhadap DPPH berkisar 20-25% dan terhadap 2,2'-Azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic (ABTS) berkisar 80-85% dibandingkan aktivitas antioksidan hasil hidrolisis menggunakan alkalase dan papain.

Berdasarkan uraian tersebut, peneliti tertarik untuk mengetahui potensi ikan sidat sebagai sumber peptida bioaktif yang memiliki aktivitas antioksidan. Penelitian ini dilakukan isolasi, karakterisasi dan uji bioaktivitas dari peptida bioaktif hasil hidrolisis protein daging ikan sidat. Daging ikan sidat dimasak terlebih dahulu sebelum dihidrolisis. Perlakuan pemanasan dilakukan untuk mengetahui kemungkinan protein dan peptida yang diperoleh setelah ikan diolah atau dimasak sebagai nutrasetikal dan makanan fungsional. Proses hidrolisis protein ikan sidat dilakukan menggunakan ekstrak kasar enzim bromelin.

Hidrolisis protein daging ikan sidat dilakukan dengan optimasi pH, suhu, waktu hidrolisis, dan konsentrasi enzim. Hidrolisat protein selanjutnya ditentukan derajat hidrolisis, dan aktivitas antioksidan. Protein hasil hidrolisis atau hidrolisat protein yang memiliki aktivitas antioksidan tertinggi kemudian di *cut off* menggunakan membrane ultrafiltrasi dengan MWCO 3 kDa, 5 kDa dan 10 kDa. Selanjutnya ditentukan aktivitas antioksidannya untuk mengetahui berat molekul peptida yang memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi.

## 1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah sebagai berikut:

1. bagaimana komposisi asam-asam amino penyusun protein daging ikan sidat?,
2. bagaimana pengaruh pH, suhu, waktu hidrolisis, dan konsentrasi enzim bromelin terhadap derajat hidrolisis pada protein dari daging ikan sidat?,
3. bagaimana aktivitas antioksidan hidrolisat protein dari daging ikan sidat?,

## 1.3 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. menentukan komposisi asam amino dari daging ikan sidat,
2. menganalisis pengaruh pH, suhu, waktu hidrolisis, dan konsentrasi enzim bromelin terhadap derajat hidrolisis pada protein dari daging ikan sidat,
3. menentukan aktivitas antioksidan hidrolisat protein dari daging ikan sidat.

#### **1.4 Manfaat Penelitian**

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat sebagai berikut:

1. dapat memberikan data ilmiah komposisi asam amino daging ikan sidat,
2. dapat memberikan informasi tentang aktivitas antioksidan peptida bioaktif dari daging ikan sidat,
3. dapat dijadikan dasar pertimbangan sebagai pangan nutrasetikal dan makanan fungsional.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Stres Oksidatif dan Antioksidan

Metabolisme oksidatif sangat penting untuk kelangsungan hidup sel. Namun proses oksidasi tersebut dapat menghasilkan radikal bebas seperti radikal lipid, R•; superoksida  $O_2\bullet$ ; peroksil,  $ROO\bullet$ ; dan hidroksil,  $HO\bullet$ ; nitrogen dioksida,  $NO_2\bullet$  (Munteanu dan Apetrei, 2021; Shahidi dan Zhong, 2015). Ketika radikal bebas berlebih terbentuk, terjadi stres oksidatif menyebabkan sebagian radikal bebas menyerang enzim pelindung seperti superoksida dismutase, katalase dan peroksidase dan terjadi kerusakan efek seluler yang mematikan (misalnya, apoptosis) dengan mengoksidasi membran lipid, protein seluler, DNA, dan enzim. Akibatnya, terjadi kematian respirasi seluler (Antolovich dkk., 2002; Pizzino dkk., 2017). Stres oksidatif memicu terjadinya penyakit kanker (Gupta dkk., 2014), hipertensi (Krzemi, 2022; Touyz dkk., 2020), diabetes melitus (Asmat dkk., 2016; Burgos-Morón dkk., 2019), dan beberapa penyakit kardiovaskular (Singh dkk., 2015).

Antioksidan adalah molekul yang cukup stabil untuk untuk menstabilkan dan menetralkan radikal bebas melalui donor elektron, sehingga mengurangi kemampuan untuk mengoksidasi atau terbentuk spesi yang tidak reaktif (Lobo dkk., 2010; Yadav dkk., 2016). Suatu molekul dikatakan antioksidan jika pada konsentrasi rendah mampu menghambat oksidasi substrat sehingga tidak terjadi kerusakan pada sel (Halliwell, 1995; Young dan Woodside, 2001). Mekanisme kerja pada antioksidan dibagi dalam dua tahap: 1. antioksidan primer, donor proton dari antioksidan ke radikal bebas; 2. antioksidan sekunder, radikal bebas antioksidan bereaksi dengan radikal bebas katalis (Antolovich dkk., 2002).

Antioksidan memiliki peran yang sangat penting dalam bidang industri makanan untuk mencegah bau tengik dan juga berperan penting pada tubuh manusia untuk melawan radikal bebas penyebab beberapa penyakit serius. Antioksidan dapat melindungi sel dan organ tubuh melawan efek berbahaya dari stres oksidatif melalui beberapa mekanisme aksi baik secara enzimatik maupun non-enzimatik. Antioksidan enzimatik dapat mengubah produk oksidatif yang

berbahaya menjadi  $H_2O_2$  kemudian menjadi air dengan bantuan kofaktor seperti tembaga, besi, seng, mangan dan selenium. Sedangkan antioksidan non-enzimatik bertindak dengan mengganggu reaksi berantai radikal bebas. Antioksidan non-enzimatik termasuk vitamin C, vitamin E, polifenol dari tanaman, karotenoid, glutathion dan senyawa antioksidan lain yang umumnya diperoleh dari tanaman (Pisoschi dkk., 2015).

## 2.2 Peptida Bioaktif

Peptida bioaktif adalah fragmen protein spesifik yang memiliki dampak positif bagi Kesehatan (Chakrabarti dkk., 2018). Peptida bioaktif didefinisikan sebagai senyawa organik yang terbentuk dari asam-asam amino melalui ikatan peptida (Apostolopoulos dkk., 2021; Mora dkk., 2018). Meskipun peptida bioaktif ditemukan secara bebas di alam, namun kebanyakan peptida bioaktif diperoleh dari hidrolisis protein secara enzimatik. Protein hasil hidrolisis disebut dengan protein hidrolisat yang terdiri dari asam-asam amino, peptida (2-10 asam amino), oligopeptida (10-20 asam amino), polipeptida (20-50 asam amino) dan protein. Beberapa peptida bioaktif diperoleh melalui sintesis (Sánchez dan Vázquez, 2017). Peptida bioaktif dapat diperoleh dari tanaman, hewan dan sumber protein dari laut. Namun, protein hidrolisat dan peptida dari berbagai sumber daya laut yang murah dan kurang dimanfaatkan seperti residu ikan, produk samping dan mikroalga telah luas digunakan digunakan untuk memproduksi protein hidrolisat dan peptida bioaktif (Tadesse dan Emire, 2020).

Peptida bioaktif memiliki beberapa bioaktivitas seperti antioksidan, antimikroba, antikanker, antiinflamasi, antihipertensi, antihiperlipidemia, antidiabetes, dan anti proliferasi (Zamora-Sillero dkk., 2018). Penelitian yang telah dilakukan oleh Abebe dkk. (2020), bahwa hidrolisis protein ikan sidat *A. japonica* menggunakan enzim alkalase berpotensi sebagai bahan makanan fungsional. Hidrolisat protein memiliki aktivitas antioksidan terhadap *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl* (DPPH) tertinggi dengan  $IC_{50} = 3,02$  mg/mL dan inhibitor ACE dengan  $IC_{50} = 110,37$  g/mL.

Takahashi dkk. (2021) melaporkan bahwa hidrolisis protein ikan salmon *Oncorhynchus keta* menggunakan *Protease P "Amano" 3SD* dari *Aspergillus melleus* diperoleh peptida Val-Pro-Ile (BM= 328,2218 Da) dan Ile-Pro-Ile (BM= 342,2389 Da) memiliki aktivitas inhibitor terhadap *Dipeptidyl peptidase-IV* (DPP-

IV) dengan  $IC_{50} = 1,0 \mu\text{g/mL}$ . Sehingga berpotensi sebagai makanan fungsional untuk pengobatan diabetes tipe II. Penelitian yang dilakukan Tkaczewska dkk. (2019), hidrolisis protein dari gelatin ikan karper *Cyprinus carpio* menggunakan *protamex*<sup>®</sup> diperoleh dipeptida Ala-Tyr (BM= 252,27 Da) dengan aktivitas antioksidan 23,76% terhadap DPPH.

### 2.3 Peptida Antioksidan

Peptida antioksidan adalah fragmen protein spesifik yang memiliki aktivitas antioksidan yang dapat mencegah penyakit akibat radikal bebas. Peptida antioksidan bekerja menghambat reaksi oksidasi dengan cara menonaktifkan spesi radikal oksigen reaktif, menangkal radikal bebas, mengkelat logam transisi prooksidatif, dan reduksi hidroperoksida (Tadesse dan Emire, 2020). Ada dua mekanisme utama antioksidan peptida bekerja dalam mendeaktif radikal bebas; 1) peptida yang mampu mengurangi radikal bebas melalui donor proton (*hydrogen atom transfer*, HAT), 2) peptida yang mampu mentransfer elektron (*single electron transfer*, SET) untuk mengurangi spesi oksidan. Peptida yang mengandung tirosin dapat mengikuti mekanisme HAT sedangkan sistein, triptofan dan histidin mengikuti mekanisme SET (Esfandi dkk., 2019).

Beberapa penelitian peptida antioksidan dari protein ikan telah dilakukan. Zhang dkk. (2021) telah melaporkan hidrolisat protein dari ikan karper kepala besar (*Aristichthys nobilis*) yang mengandung peptida bioaktif memiliki aktivitas penangkalan DPPH, ABTS, Radikal hidroksil dan kelat ion besi berturut-turut sebesar 88,79%, 57,76%, 62,72%, dan 91,46%. Penelitian isolasi peptida antioksidan telah dilakukan Bashir dkk. (2018) dari otot ikan makarel pasifik (*Scomber japonicus*) memiliki aktivitas penangkalan terhadap DPPH dan ABTS berturut-turut sebesar 71,69% dan 95,39%. Penelitian lain, Lin dkk. (2019) telah melakukan hidrolisis protein insang ikan karper kepala besar (*Hypophthalmichthys nobilis*) dan menghasilkan peptida antioksidan dengan aktivitas penangkalan terhadap DPPH dan aktivitas kelat ion besi berturut-turut 42,93% dan 73,27%. Peptida antioksidan dari protein hidrolisat ikan monk (*Lophius litulon*) telah dilaporkan oleh Hu dkk. (2020) memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai penangkalan terhadap DPPH dan radikal hidroksil yaitu 42,54% dan 41,32%.



## 2.4 Ikan Sidat (*Anguilla* spp.)

### 2.4.1 Gambaran Umum

Ikan sidat (*Anguilla* spp.) merupakan salah satu ikan komoditas ekspor yang laku di pasaran internasional seperti Jepang, Hongkong, Italia, Jerman dan beberapa negara lainnya (Affandi, 2005). Indonesia berada pada peringkat 10 di dunia sebagai pengekspor ikan sidat dengan kualitas terbaik dan harga termahal. Pada tahun 2019, ekspor ikan sidat mencapai 515.18 ton (KKP, 2020).

Ikan sidat dikenal oleh masyarakat Indonesia dengan beberapa nama daerah, Makassar: kalengkere; Bugis: masapi; Jawa: moa, lumbon, larak denong, dan pelus; Palu: Sigili (KKP, 2018). Karakteristik dari ikan sidat terdapat sirip pada dada, punggung, dan dubur. Tubuh ikan sidat bersisik kecil yang membujur, berkumpul dan terletak miring pada sudut siku terhadap kumpulan disampingnya. Warna tubuh abu-abu gelap di punggung sedangkan pada dada dan perut berwarna putih (Sadili dkk., 2015).



**Gambar 1.** Ikan sidat *Anguilla marmorata* (Froese dan Pauly, 2021)

WoRMS (2021), taksonomi ikan sidat adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Superkelas	: Pisces
Kelas	: Actinopterygii
Orde	: Anguilliformes
Famili	: Anguillidae
Genus	: <i>Anguilla</i>
Spesies	: <i>Anguilla marmorata</i>

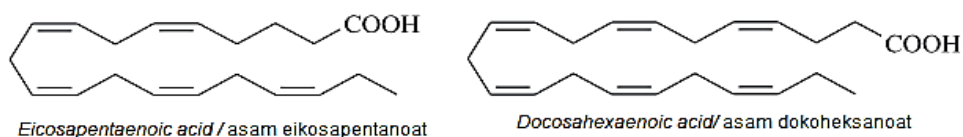
Ikan sidat termasuk golongan ikan katadromus, yaitu memijah di laut dalam kemudian bermigrasi ke hulu sungai. Hampir sebagian besar umurnya dihabiskan di perairan tawar, kemudian bermigrasi ke laut untuk memijah (Bartsch dkk., 1877; Karakoltsidis dan Constantinides, 1995). Miller dkk. (2019), ikan sidat Eropa melakukan pemijahan lepas pantai sejauh 5000-7000 km dari habitatnya dan telah melakukan pemijahan dengan melintasi 2000 km daerah laut Atlantik Utara.

#### 2.4.2. Distribusi

Ikan sidat terdistribusi luas di perairan tropis dan subtropis seperti Asia Tenggara, Jepang, Cina, Jerman, Italia, Selandia Baru, Australia, Amerika bagian timur, Kanada, dan Afrika (Arai dan Kadir, 2017). Tercatat ada 20 spesies ikan sidat di dunia (Froese dan Pauly, 2021) dan 10 diantaranya ditemukan di Indonesia : *A. bicolor pacifica*, *A. bicolor bicolor*, *A. marmorata*, *A. nebulosa nebulosa*, *A. borneensis*, *A. celebescencis*, *A. megastoma*, *A. ancentraslis*, *A. bengalensis bengalensis*, dan *A. interioris* (Affandi, 2005; Aoyama, 2009; Chai dan Arai, 2018; Suryati, 2018). Spesies *A. borneensis*, *A. celebescencis*, *A. interioris* memiliki sebaran sempit dan spesies endemik Indonesia sedangkan spesies lainnya memiliki sebaran yang luas dan keragaman genetik yang tinggi (Fahmi, 2015).

#### 2.4.3. Komposisi Kimia

Ikan sidat mengandung protein, lemak, karbohidrat, vitamin A, vitamin E dan mineral (Wijayanti dan Setiyorini, 2018). Kandungan lemak pada otot (13 % - 26%), kulit (21%-32%), dan daging (16%-26%). Kandungan lemak meningkat dengan meningkatnya massa ikan sidat (Huyen dan Linh, 2020). Berdasarkan hasil penelitian Kusharto dkk. (2014) komposisi asam lemak ikan sidat *A. bicolor* terdiri dari 32,84% asam lemak tak jenuh tunggal (MUFA), 22,78% asam lemak jenuh (SFA), 11,4% asam lemak tak jenuh ganda (PUFA), 1,5% eikosapentanoik (EPA) dan 5,16% asam dokosaheksaenoat (DHA).

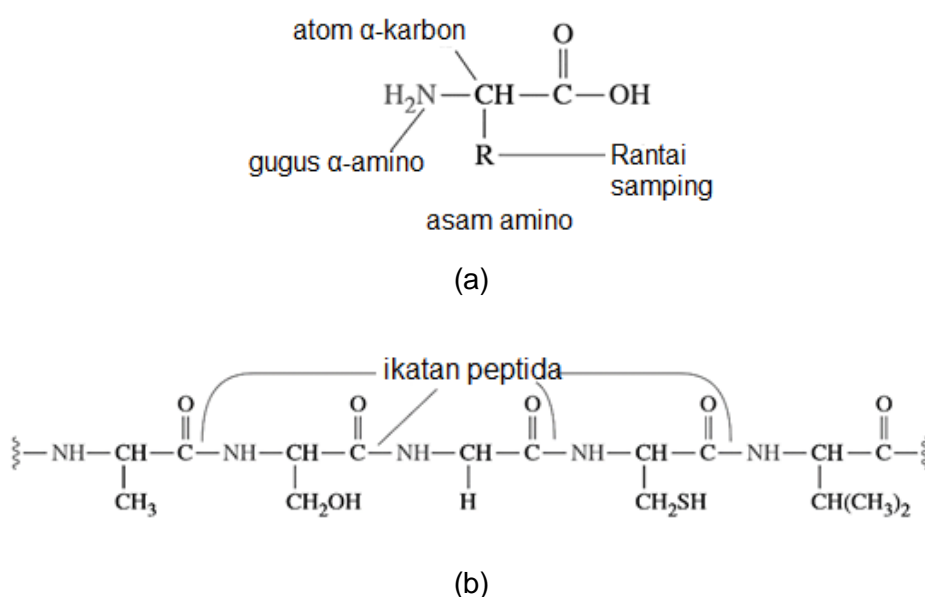


**Gambar 2.** Struktur kimia EPA dan DHA (Yi dkk., 2014)

Berdasarkan penelitian yang dilakukan Nafsiyah dkk. (2018), protein ikan sidat *A. marmorata* berkisar 17,30 % dan ikan sidat *A. bicolor bicolor* berkisar 16,78%. Penelitian yang lain, Huyen dan Linh (2020), protein ikan sidat *A. marmorata* sebesar 19,54 % dan ikan sidat *A. bicolor bicolor* berkisar 16,78%. Profil asam-asam amino pada ikan sidat *A. marmorata* telah dilaporkan Jamaluddin dkk. (2019), ditemukan 9 jenis asam amino esensial (isoleusin, leusin, lisin, tirosin, fenilalanin, treonin, triptofan, valin, dan histidin) dan 9 jenis asam amino non esensial (sistein, serin, arginin, glisin, asam aspartat, asam glutamat, alanin, prolin).

## 2.5 Protein dan Asam Amino

Asam amino adalah asam alkanolat yang mengandung gugus amino atau disebut juga asam karboksilat  $\alpha$ -amino. Asam amino dengan asam amino yang lainnya dibedakan pada substituen rantai samping (R) pada atom  $\alpha$ -karbon (Damodaran dan Parkin, 2017). Terdapat lebih dari 100 jenis asam amino yang telah diisolasi, namun hanya 20 jenis asam amino penyusun protein pada mamalia. Asam amino pada peptida atau protein terbentuk melalui ikatan kovalen yang disebut ikatan peptida (Simamora, 2015). Struktur dasar asam amino dan ikatan peptida dapat dilihat pada Gambar 3 dan 20 asam amino standar dapat dilihat pada Tabel 1.



**Gambar 3.** (a) struktur dasar asam amino, (b) contoh ikatan peptida pada pentapeptida (Damodaran dan Parkin, 2017)

**Tabel 1.** Asam-asam amino penyusun protein (Damodaran dan Parkin, 2017)

Nama	Simbol	Singkatan	Struktur	Titik Isoelektrik
Glisin	G	Gly	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{COOH} \\   \\ \boxed{\text{H}} \end{array}$	6.0
Alanin	A	Ala	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{COOH} \\   \\ \boxed{\text{CH}_3} \end{array}$	6.0
Valin	V	Val	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{COOH} \\   \\ \boxed{\begin{array}{c} \text{CH} \\ / \quad \backslash \\ \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \end{array}} \end{array}$	6.0
Leusin	L	Leu	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{COOH} \\   \\ \boxed{\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_3 \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}} \end{array}$	6.0
Isoleusin	I	Ile	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{COOH} \\   \\ \boxed{\begin{array}{c} \text{CH}-\text{CH}_2\text{CH}_3 \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}} \end{array}$	6.0
Fenilalanin	F	Phe	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{COOH} \\   \\ \boxed{\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5 \end{array}} \end{array}$	5.5
Prolin	P	Pro	$\begin{array}{c} \text{HN}-\text{CH}-\text{COOH} \\ / \quad \backslash \\ \boxed{\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C} \quad \text{CH}_2 \\ \backslash \quad / \\ \text{CH}_2 \end{array}} \end{array}$	6.3
Serin	S	Ser	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{COOH} \\   \\ \boxed{\text{CH}_2-\text{OH}} \end{array}$	5.7
Treonin	T	Thr	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{COOH} \\   \\ \boxed{\begin{array}{c} \text{HO}-\text{CH}-\text{CH}_3 \end{array}} \end{array}$	5.6

Lanjutan Tabel 1

Nama	Simbol	Singkatan	Struktur	Titik Isoelektrik
Tirosin	Y	Tyr	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{COOH} \\   \\ \text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH} \end{array}$	5.7
Sistein	C	Cys	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{COOH} \\   \\ \text{CH}_2-\text{SH} \end{array}$	5.0
Metionin	M	Met	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{COOH} \\   \\ \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_3 \end{array}$	5.7
Asparagin	N	Asn	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{COOH} \\   \\ \text{CH}_2-\text{C}-\text{NH}_2 \\    \\ \text{O} \end{array}$	5.4
Glutamin	Q	Gln	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{COOH} \\   \\ \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}-\text{NH}_2 \\    \\ \text{O} \end{array}$	5.7
Triptofan	W	Trp	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{COOH} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{Indole ring} \end{array}$	5.9
Asam Aspartat	D	Asp	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{COOH} \\   \\ \text{CH}_2-\text{COOH} \end{array}$	2.8
Asam glutamat	E	Glu	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{COOH} \\   \\ \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH} \end{array}$	3.2
Lisin	K	Lys	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{COOH} \\   \\ \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2 \end{array}$	9.7
Arginine	R	Arg	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{COOH} \\   \\ \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}-\text{NH}_2 \\    \\ \text{NH} \end{array}$	10.8
Histidin	H	His	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{COOH} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{Imidazole ring} \end{array}$	7.6

Menurut Azad (2018), asam amino dapat diklasifikasikan berdasarkan polaritas rantai samping (R), sebagai berikut:

1. Asam amino nonpolar: asam amino yang mengandung gugus rantai samping hidrokarbon alifatik dan aromatik. Contohnya: glisin, alanin, valin, leusin, isoleusin, prolin, fenilalanin, metionin dan triptofan.
2. Asam amino polar: asam amino yang mengandung unsur nitrogen, sulfur dan oksigen pada gugus rantai samping. Contohnya: serin, sistein, treonin, tirosin, asparagin dan glutamin.
3. Asam amino asam: asam amino yang mengandung lebih dari satu gugus karboksil. Contohnya: asam aspartat dan asam glutamat.
4. Asam amino basa: asam-asam amino yang mengandung lebih dari satu gugus amina. Contohnya: arginin, histidin dan lisin.

## 2.6 Hidrolisis Protein

Peptida pada umumnya tidak aktif dalam urutan protein induknya, tetapi dapat dilepaskan melalui hidrolisis secara enzimatik (*enzymatic hydrolysis*), hidrolisis secara kimia (*chemical hydrolysis*), dan hidrolisis menggunakan mikroba (*microbial hydrolysis* atau *fermentation hydrolysis*) (Gong dkk., 2020). Hidrolisis secara kimia umumnya dilakukan menggunakan larutan asam atau basa, biaya produksi yang rendah namun tidak aman terhadap lingkungan, bersifat toksik, beberapa asam amino mengalami kerusakan pada strukturnya seperti triptofan, metionin, glutamin, dan asparagin (Hou dkk., 2017; X. Wang dkk., 2017). Sedangkan pada hidrolisis secara fermentasi melibatkan mikroorganisme seperti ragi (*Saccharomyces cerevisiae*), fungi (*Aspergillus oryzae*, *A. sojae*, and *A. tamar*), dan bakteri (spesies *Bacillus* dan *Lactobacillus*). Selain mampu menghidrolisis protein, juga mikroba yang digunakan mampu menghilangkan senyawa hiper-alergi dan faktor anti nutrisi. Kekurangan metode ini karena biaya yang mahal dan produksi peptida yang tidak menentu (Rivas-Vela dkk., 2021).

Metode hidrolisis yang lain yaitu hidrolisis secara enzimatik. Hidrolisis secara enzimatik melibatkan enzim untuk memutuskan ikatan peptida pada protein. Metode ini lebih menguntungkan karena protease bekerja secara spesifik, lebih aman, cepat, dapat diprediksi dan mudah deaktivasi setelah proses hidrolisis. Tetapi enzim komersial sangat mahal. Untuk mengatasi hal tersebut, hidrolisis protein dapat menggunakan ekstrak enzim dari tanaman seperti enzim

endopeptidase, papain, bromelin, dan ficin atau berasal dari hewan seperti pepsin, tripsin, dan kemotripsin (Daliri dkk., 2017).

## 2.7 Hidrolisis Enzimatik

Hidrolisis enzimatik merupakan salah satu metode untuk produksi peptida bioaktif dengan melibatkan enzim protease atau enzim proteolitik untuk memutuskan ikatan peptida pada protein (Hai, 2020). Ikatan peptida protein dapat dipecah oleh berbagai jenis protease, yang dapat diklasifikasikan sebagai eksopeptidase dan endopeptidase berdasarkan jenis reaksinya, yaitu hidrolisis ikatan peptida di daerah terminal (eksopeptidase) atau dalam daerah internal (suatu endopeptidase) dari suatu protein. Mekanisme kerja enzim endopeptidase yang memotong rantai peptida bagian dalam sehingga produk hidrolisis protein yang dihasilkan berupa oligopeptida dan peptida sedangkan eksopeptidase menghasilkan produk berupa peptida dan asam-asam amino (Dhillon dkk., 2016). Jenis-jenis enzim protease dan terminal pemotongan ikatan peptida dapat dilihat pada Tabel 2.

**Tabel 2.** Jenis-jenis enzim protease (Hou dkk., 2017)

	<b>Enzim</b>	<b>Terminal Pemotongan</b>
Endopeptidase	Pepsin	Asam-asam amino aromatic dan hidrofobik
	Bromelain	Ala, Gly, Lys, Phe, Tyr
	Katepsin	Arg, Lys, Phe
	Ficin	Ala, Asn, Gly, Leu, Lys, Tyr, Val
	Papain	Arg, Lys, Phe
	Kimotripsin	Asam-asam amino aromatic, Leu
	Tripsin	Arg, Lys
	Rennin	Phe-met
Eksopeptidase	Aminopeptidase	Asam-asam amino terminal N
	Aminopeptidase Y	Lys Pada terminal
	Carboxypeptidase	Asam amino bersifat basa, asam dan netral
	Carboxypeptidase S	Gly pada terminal N
	Karboksipeptidase	Gly pada terminal protein

Enzim protease dapat diekstrak dari tanaman (seperti fisin dari tanaman ara, bromelin dari buah nanas, dan papain dari tanaman pepaya), hewan (seperti pepsin, kimotripsin, dan tripsin dari usus), dan mikroba (proteinase K, pronase, collagenase, subtilisin A, Alcalase®, Flavourzyme®, dan Neutrase®) (Jakubczyk dkk., 2020). Proses hidrolisis melibatkan minimal lima variabel independen: i) konsentrasi enzim; ii) rasio enzim terhadap substrat; iii) pH; iv) temperatur; v) waktu hidrolisis (Zamora-Sillero dkk., 2018). Setiap enzim memiliki kondisi optimum dalam menghidrolisis protein. Selain itu, proses hidrolisis protein juga sangat dipengaruhi struktur protein dan asam-asam amino penyusunnya. Pepsin menghidrolisis ikatan peptida pada fenilalanin dan leusin. Papain menghidrolisis ikatan peptida pada arginin, lisin dan fenilalanin (Tapal dan Tiku, 2018).

## **2.8. Bromelin**

Bromelin merupakan ekstrak enzim yang banyak diisolasi dari batang dan buah nanas. Enzim ini campuran endopeptidase tiol yang berbeda dan berbagai enzim lainnya fosfatase, glukosidase, peroksidase, selulase dan inhibitor protease (Pavan dkk., 2012; Wijeratnam, 2016). Enzim bromelin yang diekstrak dari batang disebut bromelin batang sedangkan enzim bromelin dari buah disebut bromelin buah. Bromelin batang stabil pada suhu penyimpanan  $-20^{\circ}\text{C}$  dan memiliki aktivitas proteolitik optimum pada rentang pH 6 - 8,5 dan suhu  $50^{\circ}\text{C}$  hingga  $60^{\circ}\text{C}$ . Aktivitas proteolitik tidak terpengaruh pada suhu  $80^{\circ}\text{C}$  (Grzonka dkk., 2007). Aktivitas bromelin menurun secara drastis pada rentang suhu  $85^{\circ}\text{C}$ - $95^{\circ}\text{C}$  (Poh dan Majid, 2011).

Bromelin termasuk sistein endopeptidase yang mengandung dua enzim proteolitik utama (bromelin buah dan bromelin batang) yang mengandung sulfhidril protease yaitu protease yang mengandung gugus tiol (-SH). Enzim-enzim ini memiliki residu asam amino sistein pada situs katalitiknya dan memiliki mekanisme umum dimana bagian sistein bertindak sebagai nukleofil dan menyerang elektrofил pada substrat (Wali, 2018). Kandungan jenis-jenis protease pada nanas dapat dilihat pada Tabel 3. Berbeda dengan bromelin batang, bromelin buah termasuk protease asam dengan titik isoelektrik 4,6.



**Tabel 3.** Jenis-jenis enzim protease pada nanas (Novaes dkk., 2015; Rowan dan Buttle, 1994)

Nama	Sumber	Angka EC	Berat Molekul (kDa)	Titik Isoelektrik
Bromelin Batang	Batang	EC 3.4.22.32	24,5	9,55
Bromelin Buah	Buah	EC 3.4.22.33	25	4,6
Pinguinain	Buah	EC 3.4.22.33	26	6,5
Ananain	Batang	EC 3.4.22.31	23,5	>10
Comosain	Batang	-	24,5	>10

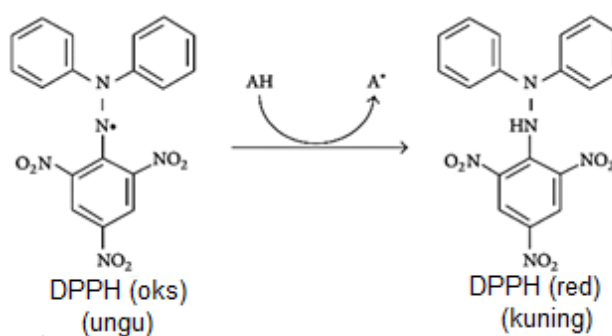
Bromelin merupakan salah satu enzim protease yang sering digunakan dalam menghidrolisis protein. Beberapa penelitian hidrolisis protein dari ikan menggunakan bromelin telah dilakukan. Gajanan dkk. (2016) telah menghidrolisis protein ikan kurisi (*Nemipterus japonicus*) dengan derajat hidrolisis sebesar 10-15% dan aktivitas penangkalan radikal bebas DPPH tertinggi 90,04%. Cheng dkk. (2020) melaporkan bahwa hidrolisis protein ikan *Anguilla marmorata* menggunakan bromelin, diperoleh derajat hidrolisis hanya berkisar 10-15% pada rasio substrat terhadap enzim 0,5-2% dan aktivitas penangkalan radikal bebas DPPH sebesar 20-25%. Sedangkan hasil penelitian Auwal dkk. (2017) menunjukkan derajat hidrolisis yang lebih tinggi terhadap protein ikan batu yaitu 54,62% dan aktivitas penangkalan radikal bebas DPPH sebesar 48,94%.

## 2.9 Uji Antioksidan

Metode DPPH merupakan metode yang paling banyak dilakukan karena sederhana, cepat dan murah (Alam dkk., 2013). DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) adalah senyawa yang cukup stabil pada suhu kamar, mengandung nitrogen radikal (Huang dkk., 2005). Senyawa antioksidan yang ada dalam medium mengubah radikal DPPH menjadi produk molekul DPPH yang lebih stabil dengan menyumbangkan elektron atau atom hidrogen. Metode DPPH didasarkan pada kemampuan senyawa antioksidan menangkalkan radikal bebas DPPH dengan menyumbang satu proton ( $H^+$ ) sehingga terjadi reduksi hidrazil (berwarna

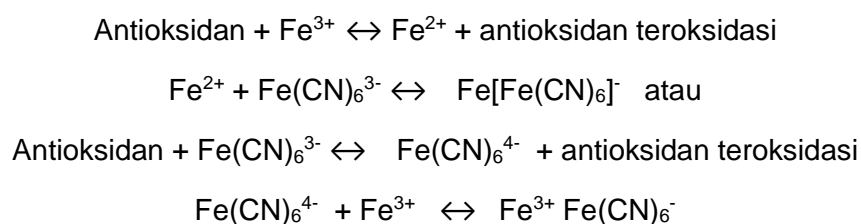
ungu) menjadi hidrazin (kuning pucat). Proses penangkalan radikal bebas DPPH mengikuti mekanisme HAT dan SET (Munteanu dan Apetrei, 2021).

Perubahan warna dari ungu radikal DPPH menjadi kuning pucat dari bentuk tereduksi DPPH memungkinkan penentuan aktivitas antioksidan secara spektrofotometri pada serapan 515-517 nm (Akar dkk., 2017). Aktivitas antioksidan DPPH dinyatakan sebagai  $EC_{50}$  atau  $IC_{50}$ .  $EC_{50}$  (*Effective concentration*) didefinisikan sebagai konsentrasi efektif untuk menurunkan konsentrasi awal DPPH sebanyak 50% sedangkan  $IC_{50}$  (*Inhibitory concentration*) didefinisikan sebagai konsentrasi yang dapat meredam 50% radikal bebas DPPH (Shahidi dan Zhong, 2015). Mekanisme reaksi pengujian DPPH dapat dilihat pada Gambar 4.



**Gambar 4.** Mekanisme reaksi pengujian DPPH

Metode pengujian antioksidan yang murah, sederhana dan cepat adalah metode kekuatan mereduksi (*Reducing Power*)  $Fe^{3+}$ . Metode kekuatan mereduksi (*Reducing Power*) merupakan metode pengujian aktivitas antioksidan mengikuti mekanisme SET untuk mengukur reduksi  $Fe^{3+}$  pada kalium ferrisianida- $Fe(III)$  menjadi  $Fe^{2+}$  yang berwarna biru prusi dalam kondisi asam (Zhong dan Shahidi, 2015). Mekanisme reaksi dapat dilihat pada Gambar 5.



**Gambar 5.** Mekanisme reaksi pada metode kekuatan mereduksi

Metode ini biasanya disebut metode FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*). Metode ini menggunakan senyawa tris piridil triazin (TPTZ) sebagai ligan pengikat Fe (Is dan Tor, 2007), namun alternatif yang lain dapat menggunakan ferrozin atau kalium ferrisianida (Shahidi dan Zhong, 2015). Dari tiga senyawa tersebut, kalium ferrisianida lebih banyak digunakan karena mudah dijumpai di laboratorium dan hasil akhirnya yang diperoleh larutan biru prusi yang dapat diukur menggunakan spektrofotometer pada serapan 700 nm (Shahi dkk., 2020).

## **2.10 Instrumen**

### **2.10.1 Sentrifugasi**

Sentrifugasi adalah metode pemisahan molekul yang memiliki kerapatan berbeda dengan memutarinya dalam larutan di sekitar sumbu (dalam rotor sentrifugal) dengan kecepatan tinggi (Stephenson, 2010). Teknik ini digunakan untuk memisahkan partikel makromolekul protein dan asam nukleat, mikromolekul, sel, subseluler atau organel virus dari campuran partikel tergantung pada ukuran, bentuk, viskositas, kepadatan, dan kecepatan rotor (Masoodi dkk., 2021). Pada pengendapan protein, proses pengendapan molekul dipengaruhi oleh kecepatan rotasi rotor dan waktu. Perbedaan kecepatan akan mempengaruhi profil protein yang mengendap (Baskoro dkk., 2017).

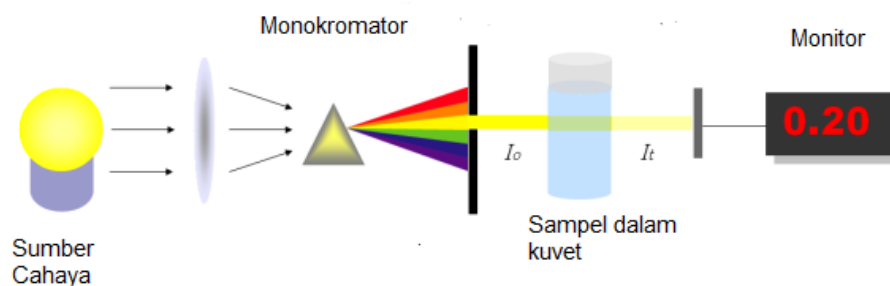
Partikel yang tersuspensi dalam media cair dengan kepadatan lebih rendah cenderung mengendap ke bawah karena gaya gravitasi. Percepatan gravitasi (g) digantikan oleh gaya sentrifugal dengan adanya medan sentrifugal. Gaya sentrifugal adalah gaya semu yang menyebabkan benda bergerak menjauhi pusat rotasi. Dibawah pengaruh gaya gravitasi (g-force), partikel terpisah sesuai ukuran, bentuk, viskositas, densitas, dan gaya sentrifugalnya (Masoodi dkk., 2021).

### **2.10.2 Spektrofotometer**

Spektrometer adalah instrumen spektroskopi yang menggunakan monokromator atau polikromator dalam hubungannya dengan transduser untuk mengubah intensitas pancaran menjadi sinyal listrik. Prinsip dari metode spektrofotometri didasarkan pada hukum absorpsi, juga dikenal sebagai hukum Beer-Lambert. Hukum Beer-Lambert memberikan informasi secara kuantitatif

bagaimana jumlah radiasi yang diserap bergantung pada konsentrasi molekul penyerap dan panjang jalur dimana penyerapan terjadi (Worsfold, 2005). Saat cahaya melintasi media yang mengandung analit penyerap, intensitasnya menurun saat analit menjadi tereksitasi. Untuk larutan analit dengan konsentrasi tertentu, semakin panjang panjang medium yang dilalui cahaya (panjang jalur cahaya), semakin banyak penyerap yang berada di jalur, dan semakin besar radiasi yang terserap. Demikian pula, untuk panjang lintasan cahaya tertentu, semakin tinggi konsentrasi penyerap, semakin kuat redamannya (Skoog dkk., 2014).

Skema kerja pada spektrofotometer ditunjukkan pada Gambar 6. Cahaya yang berasal dari lampu diteruskan melalui lensa menuju ke monokromator, kemudian cahaya akan diubah dari polikromatis menjadi cahaya monokromatis (tunggal) menggunakan penyeleksi panjang gelombang (*wavelength selector*). Selanjutnya, berkas cahaya monokromatis dilewatkan pada sampel yang. Berkas cahaya yang dilewatkan sebagian ada yang diserap (diabsorpsi) dan sebagiannya dilewatkan. Cahaya yang dilewatkan kemudian diterima oleh detektor. Cahaya yang diterima dihitung dan untuk mengetahui cahaya yang diserap sampel. Cahaya yang diserap sebanding dengan konsentrasi zat yang terkandung dalam sampel, sehingga akan diketahui konsentrasi zat dalam sampel secara kuantitatif (Pavia dkk., 2001).



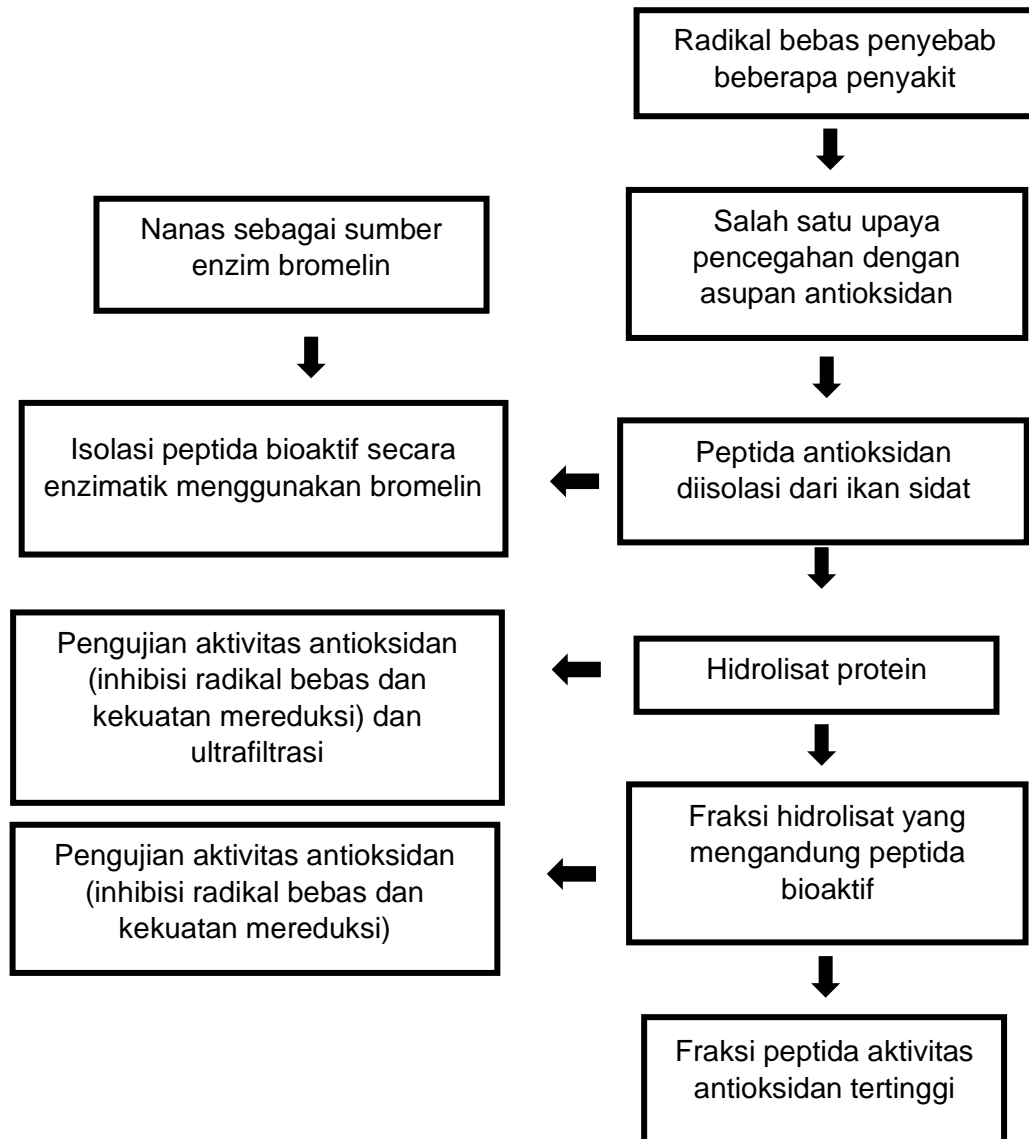
**Gambar 6.** Skema kerja spektrofotometer (Worsfold, 2005)

## 2.11 Kerangka Pikir

Radikal bebas merupakan salah satu penyebab penyakit-penyakit kronis seperti kanker, diabetes melitus, hipertensi, penyakit kardiovaskular dan penyakit neurodegeneratif. Keberadaan radikal bebas dalam tubuh yang berlebih menyebabkan stress oksidatif. Untuk mencegah terjadinya stress oksidatif, tubuh membutuhkan asupan antioksidan dari luar tubuh seperti antioksidan dari makanan. Salah satu antioksidan yang dalam beberapa dekade terakhir mengalami tren eksponensial untuk diteliti adalah peptida bioaktif. Peptida bioaktif memiliki bioaktivitas yang beragam seperti antioksidan, antikanker, antiinflamasi, antikoagulan, antibakteri dan antihipertensi serta cocok diterapkan dalam makanan atau dalam bentuk suplemen. Salah satu bioaktivitas peptida bioaktif yang banyak diteliti adalah sebagai antioksidan.

Peptida bioaktif diperoleh dari hidrolisis protein baik secara enzimatik maupun kimiawi. Dibandingkan dengan hidrolisis kimiawi, hidrolisis enzimatik lebih menguntungkan karena protease bekerja secara spesifik, lebih aman, dan mudah deaktivasi setelah proses hidrolisis. Namun salah satu kekurangannya karena enzim komersial umumnya mahal sehingga dapat diatasi menggunakan ekstrak enzim protease dari tanaman seperti bromelin.

Ikan merupakan sumber protein tinggi yang cukup menjanjikan untuk dikembangkan sebagai peptida bioaktif. Selain melimpah, ikan juga aman bagi umat islam karena bangkainya halal tanpa penyembelihan. Salah satu jenis ikan yang mengandung protein tinggi dan kurang mendapatkan perhatian adalah Ikan sidat. Ikan sidat termasuk ikan air tawar memiliki kadar protein cukup tinggi sehingga potensial sebagai sumber peptida bioaktif melalui hidrolisis menggunakan enzim. Namun salah satu tantangannya adalah enzim komersial sangat mahal sehingga diperlukan alternatif lain. Untuk mengatasi hal tersebut, hidrolisis enzimatik dapat dilakukan dengan mengkombinasikan bahan nutrasetikal dan makanan fungsional dengan bahan pangan lainnya yang diketahui mengandung enzim protease seperti nanas.



**Gambar 7.** Kerangka Pikir Penelitian

## 2.12 Hipotesis

1. Komposisi asam amino dari protein ikan sidat dapat ditentukan menggunakan *Ultra Performance Liquid Chromatography* (UPLC),
2. Pengaruh pH, suhu, waktu hidrolisis, dan konsentrasi enzim bromelin terhadap derajat hidrolisis pada protein dari daging ikan sidat dapat dianalisis,
3. Aktivitas antioksidan peptida bioaktif hasil hidrolisis dari protein ikan sidat dapat ditentukan.