

# BAB I PENDAHULUAN

## 1.1 Latar Belakang

Protein adalah makromolekul polipeptida yang memiliki peranan utama bersama dengan karbohidrat dan lipid, sebagai sumber energi dan nutrisi sehingga sangat dibutuhkan dalam menjaga kesehatan tubuh manusia (Mæhre *et al.*, 2018). Sebagai zat primer yang terdapat dalam makanan, protein melakukan fungsi biologis yang sangat penting dalam penyusunan struktur sel yang berperan dalam proses pembentukan dan pertumbuhan tubuh. Selain itu, protein sebagai sumber asam-asam amino yang mengandung unsur-unsur C, H, O, dan N juga dapat bermanfaat dalam mencegah terjadinya penyakit metabolik akibat adanya gangguan sistem metabolisme yang kompleks dalam tubuh (Q. Q. Zhou *et al.*, 2023). Pemenuhan sumber protein bagi manusia dapat diperoleh dari berbagai bahan-bahan alami, yang berasal dari protein hewani maupun protein nabati. Beberapa sumber protein yang berasal dari hewani diantaranya daging, susu, telur, dan ikan. Adapun sumber protein nabati yaitu biji-bijian, kacang-kacangan, dan sereal. Protein yang berasal dari hewani dianggap memiliki keunggulan karena asam amino esensial yang diperlukan oleh tubuh terbilang lengkap. Berbeda dengan protein nabati yang kekurangan satu atau lebih asam amino esensial dan juga banyak ditemukan kandungan antinutrien (Dolganyuk *et al.*, 2023).

Salah satu sumber protein hewani dengan kandungan gizi yang tinggi dan asam amino yang lengkap adalah ikan. Ikan merupakan bahan pangan hasil budidaya perikanan atau perikanan tangkap yang melimpah dan relatif lebih murah sehingga banyak diolah untuk menjadi pangan fungsional dan sebagai bahan obat-obatan (Natsir & Latifa, 2018). Di Indonesia salah satu komoditas perikanan dengan tingkat produksi yang tinggi adalah ikan bandeng. Ikan bandeng termasuk jenis ikan yang hidup di perairan payau dan banyak dibudidayakan dengan penerapan kawasan lahan tambak (Fadhli *et al.*, 2022). Berdasarkan data budidaya perikanan yang dikeluarkan oleh Badan Pusat Statistik (BPS) pada tahun 2023, tercatat dari tahun 2017-2020 produksi ikan bandeng di Indonesia mencapai rata-rata 802.794 ton, sedangkan di wilayah Sulawesi Selatan menempati urutan pertama jumlah produksi ikan bandeng terbesar yakni mencapai 185.079 ton (BPS, 2023). Ikan bandeng banyak diminati karena memiliki rasa yang gurih, dagingnya kenyal, tidak berbau lumpur dan tergolong ikan rendah lemak (4,8%) dan tinggi protein (20%) sehingga sangat potensial untuk dimanfaatkan sebagai sumber protein alami (Nusantari *et al.*, 2016). Secara struktural protein termasuk senyawa organik kompleks yang tersusun oleh sejumlah asam amino yang terbangun dalam rantai panjang melalui reaksi polimerisasi hingga membentuk polipeptida (W. Zhang *et al.*, 2022). Pada dasarnya urutan asam amino pada protein berjumlah lebih dari 50 asam amino. Ketika asam amino yang berikatan kurang dari 50 asam amino, dan terdiri dari 2-20 urutan asam amino secara spesifik dan memiliki fungsi biologis serta efek kesehatan bagi tubuh maka disebut peptida bioaktif (Ovando *et al.*, 2018).

Sejumlah penelitian dalam beberapa tahun terakhir, telah membuktikan bahwa peptida bioaktif memiliki potensi yang besar dalam mengatasi penyakit metabolik yang disebabkan oleh pola hidup yang tidak sehat. Salah satunya adalah diabetes

mellitus yang merupakan penyakit kronis akibat gangguan metabolik dan menjadi masalah kesehatan terbesar di dunia dan paling banyak ditangani karena perkembangannya sangat cepat serta dapat menyebabkan terjadinya komplikasi yang berujung pada kematian (Wang *et al.*, 2015). Berdasarkan data yang dikeluarkan oleh International Diabetes Federation (IDF) pada tahun 2021, kasus diabetes mellitus di seluruh dunia tercatat sebanyak 537 juta penderita dan diprediksi akan meningkat menjadi 784 juta penderita pada tahun 2045. Indonesia menempati urutan kelima penderita diabetes mellitus terbesar mencapai 19,5 juta penderita (IDF, 2021). Pencegahan dan pengendalian diabetes mellitus dengan memanfaatkan peptida bioaktif sebagai tujuan alternatif alami dianggap sangat tepat karena lebih mudah diserap oleh tubuh dibanding obat-obatan sintetik (Wan *et al.*, 2023).

Peranan peptida bioaktif juga diketahui memiliki potensi dalam terapi pengobatan kanker. Kanker adalah penyakit yang disebabkan oleh adanya perubahan (mutasi) genetik sehingga sel normal bertransformasi menjadi sel tumor yang tidak terkendali dan melampaui batasnya, bahkan dapat menyerang jaringan organ disekitarnya. Metode pengobatan kanker terus mengalami peningkatan yang signifikan seiring dengan tantangan kesehatan masyarakat dan jumlah kasus yang semakin meningkat (Nhàn *et al.*, 2023). Berdasarkan data yang dikeluarkan oleh World Health Organization (WHO) menyatakan bahwa pada tahun 2020, penyakit kanker menyebabkan terjadinya 20 juta kematian di seluruh dunia dan penyebab yang paling umum adalah kanker paru-paru, usus besar, hati, perut, dan payudara (World Health Organization, 2022). Selain itu, tantangan yang juga dihadapi dalam pengobatan kanker adalah munculnya efek samping yang merusak seperti pada penggunaan kemoterapi yang tidak memiliki kemampuan untuk membedakan antar sel kanker dan sel yang sehat. Pemanfaatan peptida bioaktif sebagai antikanker merupakan solusi yang tepat karena bersifat sitotoksik sehingga menyebabkan apoptosis (kematian sel kanker melalui gangguan membran sel) (Y. Zhang *et al.*, 2023).

Peptida bioaktif yang berasal dari hidrolisat berbahan baku ikan mengandung protein yang tinggi dan terdapat asam amino esensial yang lengkap sehingga memiliki potensi untuk dijadikan suplemen nutrisi. Protein pada ikan yang terhidrolisis secara enzimatis akan menghasilkan peptida sederhana atau asam amino yang mengandung senyawa aktif yang dapat digunakan sebagai bahan baku dalam pembuatan nutrasetikal yang memiliki aktivitas sebagai antibakteri, antidiabetes, dan toksisitas (Ahn *et al.*, 2012) (Henriques *et al.*, 2021) dan (Slizyte *et al.*, 2016). Hidrolisat protein ikan merupakan produk fungsional yang diperoleh dari proses pemotongan polipeptida protein menjadi peptida yang mempunyai berat molekul rendah dan asam amino bebas (Srikanya *et al.*, 2017). Karakteristik hidrolisat protein ikan yaitu memiliki tingkat kelarutan yang tinggi pada air, kemampuan emulsi dan mengembang yang baik, serta mudah diserap tubuh (Wijayanti *et al.*, 2016). Hidrolisis secara enzimatis merupakan suatu cara yang efektif untuk menghasilkan hidrolisat protein ikan yang memiliki gugus asam amino yang terbentuk melalui reaksi pembelahan ikatan peptida pada protein (Ghosh *et al.*, 2017). Keunggulan yang dimiliki melalui penerapan hidrolisis enzimatis secara langsung dapat menghasilkan hidrolisat protein ikan dengan kualitas yang sangat baik dengan tetap mempertahankan nilai gizi sumber protein. Hidrolisis enzimatis juga memerlukan

waktu yang lebih singkat dan dapat menargetkan ikatan peptida spesifik dan asam amino dengan bioaktivitas yang optimal. Selain itu, hidrolisis enzimatis juga tidak menghasilkan sisa pelarut organik dan bahan kimia beracun dalam produk akhirnya (Siddik *et al.*, 2021). Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa pada proses hidrolisis enzimatis, bromelin sebagai enzim proteolitik yang berasal dari batang dan buah nanas secara spesifik lebih optimal dalam menghidrolisis protein hewani, pelunak daging, dan digunakan dalam produk kecap ikan yang juga dapat berfungsi dalam meningkatkan rasa umami atau penguat rasa (*flavour*) (Gao *et al.*, 2021) (Nanda *et al.*, 2020). Berdasarkan hal tersebut pada penelitian ini dilakukan pembuatan hidrolisat protein ikan bandeng dengan memanfaatkan enzim bromelin sebagai enzim proteolitik untuk memotong rantai peptida yang memiliki bioaktivitas yang baik sebagai antibakteri, antidiabetes, dan toksisitas.

## 1.2 Rumusan Masalah

Ikan bandeng termasuk komoditas perikanan dengan tingkat produksi yang terus mengalami peningkatan di Sulawesi Selatan sehingga sangat potensial pemanfaatannya dalam berbagai produk pangan fungsional hingga kebutuhan nutrasetikal. Produk hidrolisat dari ikan bandeng menghasilkan protein tinggi yang dapat digunakan sebagai suplemen yang kaya akan sumber nutrisi yang sangat dibutuhkan oleh tubuh manusia. Selain itu, dihasilkan sumber peptida dan asam amino esensial yang tidak dapat disintesis sendiri oleh tubuh yang sangat diperlukan sebagai senyawa bioaktif yang berperan dalam pencegahan dan pengendalian gangguan metabolik seperti gangguan bakteri, diabetes mellitus, dan kanker. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mengidentifikasi gugus fungsi dan mengevaluasi aktifitas bioaktif hidrolisat protein ikan bandeng dalam menghambat pertumbuhan bakteri, sifat toksisitas terhadap sel, dan penghambatan enzim alfa amilase secara *in vitro*.

## 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini yaitu:

1. Mengetahui karakteristik gugus fungsi yang terdapat dalam hidrolisat protein ikan bandeng setelah proses hidrolisis secara enzimatis.
2. Mengetahui aktivitas antibakteri, antidiabetes, dan toksisitas dari hidrolisat protein ikan bandeng.

## 1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi terkait pengembangan ilmu pengetahuan dan teknologi mengenai alternatif alami produk pangan fungsional dan kebutuhan nutrasetikal yang berasal dari hidrolisat protein ikan bandeng dengan adanya kandungan peptida dan asam amino yang berperan sebagai agen antibakteri, antidiabetes, dan antikanker.

## **BAB II METODE PENELITIAN**

### **2.1 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Agustus 2024 – Desember 2024, bertempat di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Pangan, Laboratorium Kimia Analisa dan Pengawasan Mutu Pangan, Laboratorium Pengolahan Pangan, Program Studi Ilmu dan Teknologi Pangan, Departemen Teknologi Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Hasanuddin, Makassar.

### **2.2 Alat dan Bahan**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian adalah aerator, autoklaf, baskom, batang pengaduk, blender, botol vial, bulb, beaker glass 250 mL, cawan petri, corong, erlenmeyer, FTIR (*Fourier Transform Infrared*), gelas kimia, gelas ukur, hot plate, incubator shaker, jangka sorong, kontainer plastik, kuvet, labu ukur 100 mL, lampu pijar, magnetic stirrer, mikropipet, pipet tetes, pipet volume, pH meter, pisau, rak tabung, refraktometer, spektrofotometer UV-Vis, tabung falcon, talenan, tabung reaksi, termometer, timbangan analitik, tip mikropipet, toples, tube, dan vortex.

Bahan-bahan yang digunakan dalam Penelitian adalah akuades, amilum, aluminiumfoil, asam 3,5-dinitrosalisilat, CH<sub>3</sub>COOH, buffer pH 4, buffer pH 7, enzim alfa amilase, enzim bromelin, ikan bandeng, kertas saring, larva udang *Artemia salina leach*, latex, Na-K-Tartarat, NaCL, NaOH, MHA (Mueller Hinton Agar), papper disc, swab test, dan tisu.

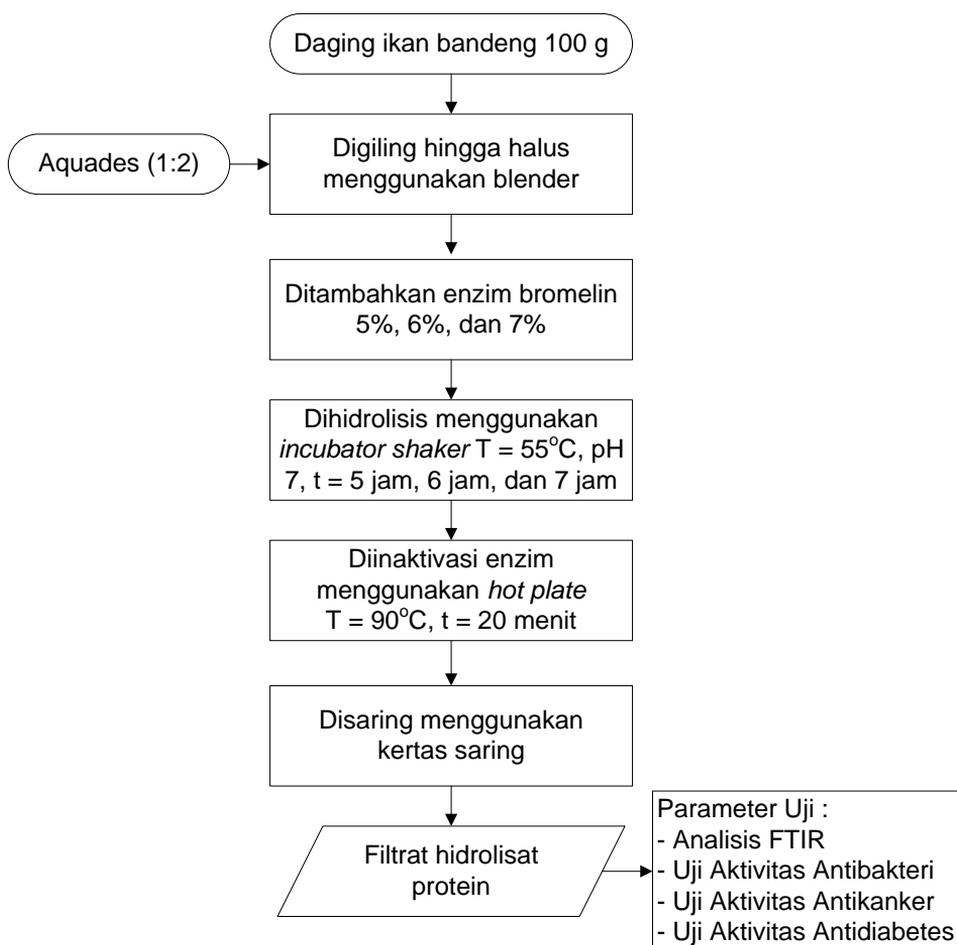
### **2.3 Desain Penelitian**

Penelitian ini menggunakan desain rancangan acak lengkap (RAL) faktorial yang 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).

### **2.4 Prosedur Penelitian**

#### **2.4.1 Pembuatan Hidrolisat Protein Ikan Bandeng (*Chanos chanos*) (Wijayanti *et al.*, 2016)**

Daging ikan bandeng yang telah dipreparasi dilakukan penambahan enzim bromelin dengan konsentrasi 5%, 6%, dan 7% (b/v). Kemudian dihidrolisis pada suhu 55°C dengan menggunakan incubator shaker dengan pengatur suhu selama 5 jam, 6 jam, dan 7 jam. Selanjutnya diatur pH sampai memperoleh pH 7 dengan penambahan CH<sub>3</sub>COOH sebagai pengatur suasana asam dan NaOH sebagai pengatur suasana basa. Selanjutnya dilakukan penginaktifan enzim dengan cara pemanasan pada suhu 90°C selama 20 menit menggunakan *hot plate*. Kemudian, dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring sehingga diperoleh filtrat hidrolisat protein ikan bandeng.



Gambar 1. Diagram Alir Proses Pembuatan Hidrolisat Protein Ikan Bandeng (*Chanos chanos*)

## 2.5 Parameter Pengujian

### 2.5.1 Karakteristik Gugus Fungsi Hidrolisat Protein Ikan Bandeng (*Chanos chanos*) (FTIR) (Yathisha *et al.*, 2022)

Karakterisasi FTIR (Fourier Transform Infrared) dilakukan untuk mengetahui struktur kimia dan gugus fungsi penyusun utama dari hidrolisat protein ikan bandeng berdasarkan intensitas spektrum inframerahnya. Penggunaan instrumen FTIR didasarkan pada penyerapan molekul-molekul sampel terhadap radiasi inframerah pada panjang gelombang antara 500-4000  $\text{cm}^{-1}$ . Posisi dan intensitas puncak dalam spektrum inframerah digunakan untuk mengidentifikasi gugus-gugus fungsi sesuai dengan pembandingan yang telah ada pada FTIR spectra table.

### 2.5.2 Uji Aktivitas Antibakteri Hidrolisat Protein Ikan Bandeng (*Chanos chanos*) (Nurhayati et al., 2020)

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi agar menggunakan kertas cakram (*paper disc*). Bakteri uji yang digunakan adalah bakteri *E. coli* (gram negatif) dan *Staphylococcus aureus* (gram positif) yang diinokulasikan pada cawan petri yang berisi media MHA dengan cara penggosokan 4 arah menggunakan *swab test* steril. Kertas cakram steril yang telah direndam dalam sampel kemudian diletakkan pada permukaan media yang sebelumnya telah diinokulasikan bakteri lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam. Setelah itu, diamati zona penghambatan yang terbentuk dan diukur diameternya menggunakan jangka sorong dalam milimeter.

### 2.5.3 Uji Aktivitas Toksisitas Hidrolisat Protein Ikan Bandeng (*Chanos chanos*) (Fitriyanti et al., 2024)

Pengujian aktivitas toksisitas dilakukan dengan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) berdasarkan tingkat toksisitas sampel hidrolisat protein ikan bandeng menggunakan larva udang (*Artemia salina L.*). Penyiapan larva *Artemia salina L.* dilakukan penetasan telur larva dalam media air laut buatan dengan menambahkan 38 g NaCl ke dalam 1 L aquades hingga mencapai salinitas 5-35 ppt dan diberi pasokan oksigen menggunakan aerator serta lampu pijar sebagai penerangan selama 48 jam hingga telur menetas menjadi larva.

Pembuatan larutan uji diawali dengan menimbang sampel sebanyak 200 mg, kemudian ditambahkan air laut buatan hingga mencapai volume 10 mL dan diperoleh konsentrasi induk 2000 ppm, selanjutnya dibuat larutan uji dengan konsentrasi 500 ppm, 100 ppm, dan 50 ppm. Pengujian dilakukan dengan menggunakan 10 ekor larva udang *Artemia salina L.* yang dipindahkan ke dalam wadah pengujian berisi 2 mL air laut buatan dan ditambahkan larutan uji sesuai konsentrasi, kemudian setiap wadah pengujian dicukupkan hingga volume 5 mL dengan air laut buatan. Selanjutnya diinkubasi selama 24 jam dan diamati jumlah larva yang mati. Hasil yang diperoleh selanjutnya dihitung persen kematian (mortalitas) untuk mencari nilai probit yang digunakan untuk menentukan nilai LC<sub>50</sub>. Berikut rumus yang digunakan :

$$\% \text{ kematian} = \frac{\text{jumlah larva mati}}{\text{jumlah larva uji}} \times 100$$

Nilai LC<sub>50</sub>. kemudian dihitung dengan persamaan persamaan regresi linier,  $y = ax + b$  dengan keterangan :

y = nilai probit

x = log konsentrasi

a = intercept (garis potong)

b = slope (kemiringan dari garis regresi linier)

Nilai LC<sub>50</sub>. merupakan nilai y yang dimasukkan ke dalam nilai x = 50%.

#### 2.5.4 Uji Aktivitas Antidiabetes Hidrolisat Protein Ikan Bandeng (*Chanos chanos*) (Wulandari et al., 2020)

Pengujian aktivitas antidiabetes dilakukan dengan metode penghambatan aktifitas enzim alfa amilase dalam memecah substrat pati menggunakan sampel hidrolisat protein ikan bandeng. Pembuatan larutan uji diawali dengan menimbang sampel sebanyak 100 mg, kemudian ditambahkan buffer fosfat pH 7 hingga mencapai 10 mL dan diperoleh konsentrasi induk 1000 ppm, kemudian dibuat larutan uji dengan konsentrasi 1000 ppm, 800 ppm, 600 ppm, 400 ppm, dan 200 ppm. Selanjutnya masing-masing sampel ditambahkan larutan enzim alfa amilase 20 U/mL sebanyak 0.5 mL ke dalam tabung reaksi, kemudian diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Larutan tersebut kemudian ditambahkan larutan amilum 1% sebanyak 0,5 mL dan diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 5 menit. Reaksi dihentikan dengan pemberian reagen DNS sebanyak 0,5 mL dan dipanaskan dalam air mendidih di atas hot plate selama 3 menit, kemudian didinginkan pada suhu ruang. Setelah itu, diukur absorbansi tiap larutan pada panjang gelombang 540 nm dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Hasil yang diperoleh selanjutnya dihitung persen penghambatan enzim alfa amilase untuk menentukan nilai IC<sub>50</sub>. Berikut rumus yang digunakan :

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Abs. (kontrol)} - \text{Abs. (sampel)}}{\text{Abs. (kontrol)}} \times 100$$

Nilai IC<sub>50</sub>. kemudian dihitung dengan persamaan persamaan regresi linier,  $y = ax + b$  dengan keterangan :

- y = nilai % penghambatan
- x = konsentrasi sampel
- a = intercept (garis potong)
- b = slope (kemiringan dari garis garis regresi linier)

Nilai IC<sub>50</sub> merupakan nilai y yang dimasukkan ke dalam nilai x = 50%.

#### 2.6 Analisis Data

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 3 kali pengulangan. Data yang diperoleh akan dianalisis statistik menggunakan *Analysis of variance* (ANOVA), jika terdapat pengaruh nyata maka akan dilakukan uji lanjut dengan uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) ( $p \leq 0,05$ ) pada aplikasi SPSS 25.