

**KARAKTERISTIK HIDROLISAT PROTEIN IKAN SAPU-SAPU  
(*Pterygoplichthys pardalis*) MENGGUNAKAN pH DAN  
LAMA HIDROLISIS YANG BERBEDA**

**SKRIPSI**

Oleh :

**LINA WIDYA SARI  
NIM. 155080300111032**



**PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN  
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN  
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2019**

**KARAKTERISTIK HIDROLISAT PROTEIN IKAN SAPU-SAPU  
(*Pterygoplichthys pardalis*) MENGGUNAKAN pH DAN  
LAMA HIDROLISIS YANG BERBEDA**

**SKRIPSI**

**PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN  
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN**

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Meraih Gelar Sarjana Perikanan  
di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan  
Universitas Brawijaya

Oleh :

**LINA WIDYA SARI  
NIM. 155080300111032**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2019**

**HALAMAN PENGESAHAN**

**SKRIPSI**

**KARAKTERISTIK HIDROLISAT PROTEIN IKAN SAPU-SAPU  
(*Pterygoplichthys pardalis*) MENGGUNAKAN pH DAN  
LAMA HIDROLISIS YANG BERBEDA**

Oleh :

**LINA WIDYA SARI  
NIM. 155080300111032**

Telah dipertahankan di depan penguji  
pada tanggal 24 Juni 2019  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui,  
Dosen Pembimbing 1,

Menyetujui,  
Dosen Pembimbing 2,



Rahmi Nurdiani, S.Pi, M.App.Sc, PhD  
NIP. 19761116 200112 2 001

Tanggal: 12 JUL 2019



Dr. Sc. Asep Awaludin P., S.Pi, MP  
NIP. 19810602 200604 1 001

Tanggal: 12 JUL 2019



Mengetahui,  
Ketua Jurusan MSP

Dr. Ir. Muhammad Firdaus, MP  
NIP. 19680919 200501 1 001

Tanggal: 12 JUL 2019



**IDENTITAS TIM PENGUJI**

Judul : **KARAKTERISTIK HIDROLISAT PROTEIN IKAN SAPU-SAPU (*Pterygoplichthys pardalis*) MENGGUNAKAN pH DAN LAMA HIDROLISIS YANG BERBEDA**

Nama Mahasiswa : LINA WIDYA SARI  
NIM : 155080300111032  
Program Studi : Teknologi Hasil Perikanan

**DOSEN PEMBIMBING:**

Pembimbing 1 : Rahmi Nurdiani, S.Pi, M.App.Sc, PhD  
Pembimbing 2 : Dr. Sc. Asep Awaludin Prihanto, S.Pi, MP

**DOSEN Bukan PEMBIMBING:**

Dosen Penguji 1 : Dr. Ir. Anies Chamidah, MP  
Dosen Penguji 2 : Ir. Sri Dayuti, MP  
Tanggal Ujian : 24 Juni 2019

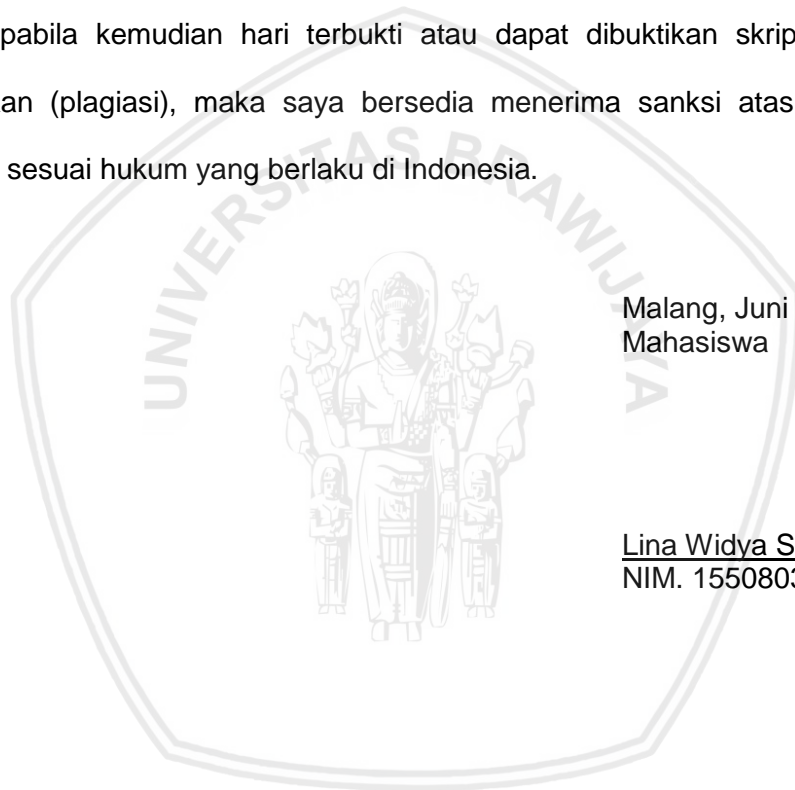
## PERNYATAAN ORISINALITAS

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali yang tertulis dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil penjiplakan (plagiasi), maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut, sesuai hukum yang berlaku di Indonesia.

Malang, Juni 2019  
Mahasiswa

Lina Widya Sari  
NIM. 155080300111032



## UCAPAN TERIMAKASIH

Pada kesempatan ini, penulis mengucapkan terimakasih kepada:

1. Allah SWT atas karunia dan kesehatan yang diberikan selama ini sehingga laporan skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik.
2. Bapak Djumin selaku ayah saya, Slamet dan Wulandari selaku kakak saya serta Zaneta selaku keponakan saya yang telah memberikan doa serta dukungan selama kegiatan dan penyusunan laporan skripsi ini. Seorang yang selalu saya rindukan almarhumah Ibu Murni selaku ibu saya yang nasihatnya selalu saya ingat, semoga beliau ditempatkan di tempat terbaik disisi Allah SWT.
3. Bapak Dr. Ir. Muhamad Firdaus, MP. selaku Ketua Jurusan Manajemen Sumberdaya Perairan.
4. Ibu Rahmi Nurdiani, S.Pi, M.App.Sc, PhD selaku dosen pembimbing I dan Bapak Dr. Sc. Asep Awaludin Prihanto, S.Pi., MP selaku dosen pembimbing II yang senantiasa memberi gagasan, ide, dukungan, saran dan motivasi.
5. Teman-teman terbaik saya Nessa, Fifda, Fitria, Lilis, Eka, Prila, Winda, Avi dan Yuli.
6. Annas, Margaretha, Ramadhan, Erda, Gofur, Oryza, Nurul dan Dewi selaku teman-teman tim bimbingan yang saling mendukung satu sama lain serta keluarga besar Teknologi Hasil Perikanan 2015.
7. Tim Bioseafood yang telah memberikan dukungan dan bantuan baik berupa alat maupun bahan kepada penulis selama penelitian berlangsung.

Malang, Juni 2019

Lina Widya Sari

## RINGKASAN

**LINA WIDYA SARI.** Skripsi tentang Karakteristik Hidrolisat Protein Ikan Sapu-Sapu (*Pterygoplichthys pardalis*) Menggunakan pH dan Lama Hidrolisis yang Berbeda (dibawah bimbingan **Rahmi Nurdiani, S.Pi, M.App.Sc, PhD** dan **Dr. Sc. Asep Awaludin P., S.Pi, MP**).

Ikan sapu-sapu (*Pterygoplichthys pardalis*) merupakan ikan air tawar dalam famili Loricariidae yang berasal dari Amerika. Ikan sapu-sapu sering dianggap sebagai spesies invasif, yang artinya dapat menjadi predator maupun kompetitor terhadap ikan-ikan domestik. Ikan sapu-sapu memiliki kandungan protein sedang tetapi belum banyak dimanfaatkan masyarakat sebagai sumber pangan, sehingga perlu dikonversi menjadi produk fungsional berupa hidrolisat protein ikan (HPI). Hidrolisat protein ikan merupakan produk yang dihasilkan dari penguraian protein ikan menjadi peptida sederhana dan asam amino melalui proses hidrolisis oleh enzim, asam, atau basa. Penelitian mengenai pemanfaatan ikan sapu-sapu sebagai bahan HPI masih terbatas, sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut menggunakan kombinasi perlakuan pH dan lama hidrolisis untuk mengetahui karakteristik produk yang dihasilkan.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui hasil perlakuan terbaik dari kombinasi faktor pH dan lama hidrolisis berbeda serta mengetahui karakteristik hidrolisat protein ikan sapu-sapu (*Pterygoplichthys pardalis*) yang dihasilkan. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari-Maret 2019 yang bertempat di Laboratorium Perekayasaan Hasil Perikanan, Laboratorium Hidrologi, Laboratorium Keamanan Hasil Pangan dan Laboratorium Nutrisi dan Pakan Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang. Pengujian asam amino dilakukan di Laboratorium Saraswanti Indo Genetech, Bogor.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen laboratoris. Rancangan percobaan dalam penelitian utama adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 2 faktor yaitu pH (kontrol, 5, 7, 9) dan lama hidrolisis (12 dan 24 jam) dengan menggunakan 3 kali ulangan. Data hasil penelitian dianalisis menggunakan ANOVA (*Analysis of Variance*), apabila didapatkan hasil berbeda nyata maka dilanjutkan dengan uji Tukey menggunakan aplikasi Minitab 18. Perlakuan terbaik ditentukan dengan metode *Response Surface Method* (RSM) yang disajikan dalam *contour plot* dari hasil beberapa parameter menggunakan aplikasi Minitab 18.

Hasil analisa sidik ragam menunjukkan bahwa perlakuan lama hidrolisis, pH dan interaksi keduanya memberikan hasil berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) terhadap parameter rendemen, aktifitas antioksidan, derajat hidrolisis, kadar protein dan kadar abu HPI sapu-sapu. Perlakuan lama hidrolisis dan pH berbeda nyata ( $P < 0,05$ ), sementara interaksi keduanya tidak berbeda nyata ( $p > 0,05$ ) terhadap parameter kadar air. Perlakuan pH berbeda nyata ( $P < 0,05$ ), sementara lama hidrolisis dan interaksi keduanya tidak berbeda nyata ( $p > 0,05$ ) terhadap parameter kadar lemak. Hasil perlakuan terbaik pada pembuatan HPI sapu-sapu penelitian ini yaitu kombinasi pH 9 dan lama hidrolisis 24 jam. Karakteristik HPI yang dihasilkan memiliki rendemen 57,39%, aktivitas antioksidan 63,99%, DH 40,67%, kadar air 7,28%, kadar abu 7,63%, kadar lemak 5,10%, kadar protein 34,51%, serta kisaran berat molekul 6,14 -118,17 KDa. Total asam amino esensial 49,30% dan asam amino non esensial 50,71%.



## KATA PENGANTAR

*Assalamu'allaikum waa rahmatullahi waa barakatuuh*

Salam sejahtera bagi kita semua.

Puji syukur kepada Allah SWT, atas berkat rahmat dan hidayah-Nya penulis dapat menyelesaikan laporan skripsi berjudul "**Karakteristik Hidrolisat Protein Ikan Sapu-Sapu (*Pterygoplichthys pardalis*) Menggunakan pH dan Lama Hidrolisis yang Berbeda**". Laporan skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat dalam meraih gelar Sarjana Perikanan Strata I di Program Studi Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang.

Penyusunan laporan skripsi ini tidak akan berjalan dan tersusun dengan baik tanpa adanya bantuan dosen pembimbing serta berbagai pihak yang telah memberikan dukungan baik secara *moril* ataupun *materiil*. Penulis mengucapkan terimakasih kepada semua pihak yang terlibat dalam penulisan laporan skripsi ini. Penulis menyadari bahwa laporan skripsi ini masih banyak kekurangan. Kritik dan saran yang membangun sangat penulis harapkan demi terciptanya karya tulis lain yang lebih baik.

Semoga laporan skripsi ini dapat bermanfaat serta menambah wawasan bagi para pembaca dan juga penulis. Sekian kata pengantar yang bisa penulis sampaikan, apabila ada kekurangan atau sedikit kesalahan dalam cetakan mohon dimaafkan.

*Wassalamu'allaikum warahmatullahi wabarakatuuh.*

Malang, Juni 2019

Penulis



## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>SAMPUL</b> .....	<b>i</b>
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	<b>ii</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	<b>iii</b>
<b>IDENTITAS TIM PENGUJI</b> .....	<b>iv</b>
<b>PERNYATAAN ORISINALITAS</b> .....	<b>v</b>
<b>UCAPAN TERIMAKASIH</b> .....	<b>vi</b>
<b>RINGKASAN</b> .....	<b>vii</b>
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	<b>viii</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>ix</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>xi</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>xii</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	<b>xiii</b>
<b>1. PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	3
1.3 Tujuan Penelitian .....	3
1.4 Hipotesis .....	3
1.5 Kegunaan .....	3
1.6 Tempat dan Waktu .....	3
<b>2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>4</b>
2.1 Ikan Sapu-Sapu ( <i>Pterygoplichthys pardalis</i> ).....	4
2.1.1 Klasifikasi Ikan Sapu-Sapu ( <i>Pterygoplichthys pardalis</i> ).....	5
2.1.2 Morfologi Ikan Sapu-Sapu ( <i>Pterygoplichthys pardalis</i> ).....	6
2.1.3 Habitat Ikan Sapu-Sapu ( <i>Pterygoplichthys pardalis</i> ) .....	6
2.1.4 Kandungan Gizi Ikan Sapu-Sapu ( <i>Pterygoplichthys pardalis</i> ) .....	7
2.2 Hidrolisat Protein Ikan (HPI) .....	8
2.2.1 Hidrolisis Enzimatis .....	9
2.2.2 Proses Hidrolisis.....	10
2.2.3 pH dan Lama Hidrolisis.....	11
2.2.4 Metode Pembuatan Hidrolisat Protein Ikan.....	12
2.2.5 Manfaat Hidrolisat Protein Ikan.....	13
2.3 Karakteristik Hidrolisat Protein Ikan.....	15
<b>3. METODE PENELITIAN</b> .....	<b>17</b>
3.1 Materi Penelitian .....	17
3.1.1 Alat Penelitian .....	17
3.1.2 Bahan Penelitian .....	17
3.2 Metode Penelitian .....	18
3.2.1 Metode .....	18
3.2.2 Variabel Penelitian.....	19
3.3 Rancangan Penelitian .....	20
3.3.1 Rancangan Penelitian Pendahuluan.....	20
3.3.2 Rancangan Penelitian Utama .....	20
3.4 Prosedur Penelitian.....	22
3.4.1 Preparasi Sampel.....	22
3.4.2 Prosedur Penelitian Pendahuluan .....	25

3.4.3	Prosedur Penelitian Utama .....	27
3.5	Parameter Uji .....	29
3.5.1	Rendemen HPI Cair .....	29
3.5.2	Aktivitas Antioksidan HPI Cair .....	30
3.5.3	Derajat Hidrolisis HPI Cair .....	30
3.5.4	Kadar Protein HPI Cair .....	31
3.5.5	Kadar Air HPI Serbuk .....	32
3.5.6	Kadar Abu HPI Serbuk .....	33
3.5.7	Kadar Lemak HPI Serbuk .....	33
3.5.8	Berat Molekul HPI Cair .....	34
3.5.9	Penentuan Perlakuan Terbaik .....	36
3.5.10	Asam Amino HPI Cair.....	37
<b>4.</b>	<b>HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>38</b>
4.1	Penelitian Pendahuluan .....	38
4.1.1	Rendemen HPI Cair .....	39
4.1.2	Aktivitas Antioksidan HPI Cair .....	41
4.2	Penelitian Utama.....	43
4.2.1	Rendemen HPI Cair .....	44
4.2.2	Aktivitas Antioksidan HPI Cair .....	46
4.2.3	Derajat Hidrolisis HPI Cair .....	48
4.2.4	Kadar Protein HPI Cair .....	49
4.2.5	Kadar Air HPI Serbuk .....	52
4.2.6	Kadar Abu HPI Serbuk .....	54
4.2.7	Kadar Lemak HPI Serbuk .....	56
4.2.8	Berat Molekul HPI Cair .....	58
4.2.9	Penentuan Perlakuan Terbaik .....	60
4.2.10	Asam Amino HPI Cair.....	62
<b>5.</b>	<b>KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>	<b>65</b>
5.1	Kesimpulan .....	65
5.2	Saran.....	65
	<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>66</b>
	<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>73</b>



## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Kandungan Gizi Ikan Sapu-Sapu dari Waduk Cirata.....	7
2. Penggolongan Ikan Berdasarkan Kandungan Lemak dan Protein .....	8
3. Persyaratan Mutu Hidrolisat Protein Ikan Komersil .....	15
4. Persyaratan Asam Amino Hidrolisat Protein Ikan Komersil .....	16
5. Kombinasi Perlakuan dan Ulangan pada Penelitian Pendahuluan.....	20
6. Kombinasi Perlakuan dan Ulangan dalam Penelitian Utama.....	21
7. Hasil Uji Proksimat Bahan Baku Ikan Sapu-Sapu .....	38
8. Jumlah Pita ( <i>Band</i> ) Hidrolisat Protein Ikan Sapu-Sapu .....	59
9. Hasil Perlakuan Terbaik HPI Sapu-Sapu .....	62
10. Hasil Komposisi Asam Amino HPI Sapu-Sapu.....	63



## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Sampel Ikan Sapu-Sapu ( <i>Pterygoplichthys pardalis</i> ).....	5
2. Lapisan Fraksi .....	11
3. Pengambilan Sampel di Kota Blitar.....	23
4. Diagram Alir Preparasi Sampel.....	23
5. Diagram Alir Pembuatan Larutan HCl 6 N.....	24
6. Diagram Alir Pembuatan Larutan NaOH 6 N.....	25
7. Diagram Alir Pembuatan HPI Sapu-Sapu pada Penelitian Pendahuluan .....	27
8. Diagram Alir Pembuatan HPI Sapu-Sapu pada Penelitian Utama.....	29
9. Lapisan Fraksi Hidrolisat Protein Ikan Sapu-Sapu .....	39
10. Rendemen HPI Sapu-Sapu Penelitian Pendahuluan .....	40
11. Perubahan Warna Larutan HPI.....	41
12. Antioksidan HPI Sapu-Sapu Penelitian Pendahuluan .....	42
13. Hasil HPI Sapu-Sapu .....	43
14. Rendemen Hidrolisat Protein Ikan Sapu-Sapu .....	44
15. Nilai Aktivitas Antioksidan Hidrolisat Protein Ikan Sapu-Sapu .....	46
16. Derajat Hidrolisis Hidrolisat Protein Ikan Sapu-Sapu.....	48
17. Kadar Protein Hidrolisat Protein Ikan Sapu-Sapu.....	50
18. Kadar Air Hidrolisat Protein Ikan Sapu-Sapu.....	52
19. Kadar Abu Hidrolisat Protein Ikan Sapu-Sapu.....	54
20. Kadar Lemak Hidrolisat Protein Ikan Sapu-Sapu .....	56
21. Pita Protein HPI Sapu-Sapu Hasil SDS-PAGE.....	58
22. Grafik <i>Contour Plot</i> HPI Sapu-Sapu.....	61

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Proses Pembuatan HPI Sapu-Sapu ( <i>Pterygoplichthys pardalis</i> ) .....	73
2. Diagram Alir Pengujian Aktivitas Antioksidan .....	75
3. Diagram Alir Pengujian Derajat Hidrolisis.....	76
4. Diagram Alir Pengujian Kadar Protein.....	77
5. Diagram Alir Pengujian Kadar Air.....	78
6. Diagram Alir Pengujian Kadar Abu.....	79
7. Diagram Alir Pengujian Kadar Lemak .....	80
8. Diagram Alir Pengujian Berat Molekul SDS-PAGE.....	81
9. Diagram Alir Pengujian Asam Amino UPLC (SIG, 2012).....	82
10. Perhitungan dalam Pembuatan Larutan.....	83
11. Perhitungan dan komposisi larutan SDS-PAGE.....	84
12. Analisa Sidik Ragam Pengaruh Lama Hidrolisis dan pH terhadap Rendemen Hidrolisat Protein Ikan Sapu-Sapu .....	88
13. Analisa Sidik Ragam Pengaruh Lama Hidrolisis dan pH terhadap Nilai Penghambatan Radikal Bebas Hidrolisat Protein Ikan Sapu-Sapu.....	89
14. Analisa Sidik Ragam Pengaruh Lama Hidrolisis dan pH terhadap Derajat Hidrolisis Hidrolisat Protein Ikan Sapu-Sapu.....	90
15. Analisa Sidik Ragam Pengaruh Lama Hidrolisis dan pH terhadap Kadar protein Hidrolisat Protein Ikan Sapu-Sapu .....	91
16. Analisa Sidik Ragam Pengaruh Lama Hidrolisis dan pH terhadap Kadar Air Hidrolisat Protein Ikan Sapu-Sapu .....	92
17. Analisa Sidik Ragam Pengaruh Lama Hidrolisis dan pH terhadap Kadar Abu Hidrolisat Protein Ikan Sapu-Sapu .....	93
18. Analisa Sidik Ragam Pengaruh Lama Hidrolisis dan pH terhadap Kadar Lemak Hidrolisat Protein Ikan Sapu-Sapu.....	94
19. Kurva Standar <i>Marker</i> Protein SDS-PAGE .....	95
20. Grafik Nilai Optimasi HPI Sapu-Sapu.....	97
21. Hasil Pengujian Karakteristik HPI Sapu-Sapu dengan Perlakuan pH dan Lama Hidrolisis yang Berbeda serta Standar HPI.....	98

## 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Ikan sapu-sapu (*Pterygoplichthys pardalis*) merupakan ikan air tawar dalam famili Loricariidae yang berasal dari Amerika. Secara internasional, ikan ini dikenal dengan nama *plecostomus* yang kemudian disingkat menjadi *plecos* atau *plecs*. Ikan sapu-sapu biasa mengonsumsi tumbuhan air, detritus, dan alga yang menempel pada batu. Ikan ini juga mengonsumsi bangkai ikan lain yang tenggelam, ikan-ikan yang lebih kecil serta limbah organik hasil buangan rumah tangga, sehingga ikan sapu-sapu tergolong sebagai ikan omnivora (Susanto, 2004).

Ikan sapu-sapu dapat dijumpai diberbagai lokasi seperti sungai Ciliwung yang memiliki tingkat polusi sangat tinggi (Qoyyimah *et al.*, 2016). Adanya ikan sapu-sapu ditandai dengan lubang-lubang di pinggiran sungai sebagai tempat peletakan telur setelah pemijahan (Nico dan Martin, 2012). Populasi ikan sapu-sapu berdampak negatif karena menjadi spesies invasif. Ikan sapu-sapu lebih kebal terhadap pencemaran perairan, sehingga ikan ini dapat mendominasi suatu perairan dan menjadi predator atau kompetitor ikan-ikan domestik (Hadiaty, 2011). Ikan sapu-sapu memiliki kulit yang keras dan bentuk yang menyeramkan, sehingga ikan ini belum banyak dimanfaatkan masyarakat sebagai sumber pangan (Trisnawati, 2007).

Saat ini, konversi ikan yang kurang bermanfaat menjadi produk fungsional sangat menarik bagi para ilmuwan pangan di dunia. Pemanfaatan yang tepat dari spesies ikan yang kurang bermanfaat salah satunya dengan mengubah menjadi hidrolisat protein ikan (Hsu, 2010). Hidrolisat protein ikan, menurut Chalamaiah *et*

*al.* (2012), dianggap sebagai sumber protein dan peptida bioaktif yang paling penting.

Hidrolisat protein ikan merupakan produk yang dihasilkan dari penguraian protein ikan menjadi peptida sederhana dan asam amino melalui proses hidrolisis oleh enzim, asam, atau basa (Latifah, 2013). Hidrolisat protein yang dilakukan secara enzimatik mampu menguraikan protein menjadi peptida yang lebih kecil. Hidrolisat protein secara umum merupakan fragmen kecil peptida yang mengandung 2-20 asam amino (Chalamaiah *et al.*, 2012). Pemilihan jenis enzim pada pembuatan hidrolisat merupakan hal yang sangat penting. Penggunaan enzim komersial memiliki kelemahan karena harganya yang mahal, sehingga solusi yang bisa diambil yaitu menggunakan enzim endogen yang sebagian besar berasal dari saluran pencernaan dan hati ikan (Souissi *et al.*, 2007). Penelitian pendahuluan mengenai pembuatan hidrolisat protein ikan menggunakan enzim endogen telah dilakukan dengan sampel ikan *alaska pollack* (Je *et al.*, 2005), sampel otot ikan kurisi (Nalinanon *et al.*, 2011), sampel ikan baramundi, ikan *silver warehou*, dan ikan salmon (Nurdiani *et al.*, 2015). Pembuatan hidrolisat protein ikan harus melalui pemilihan kondisi hidrolisis yang tepat agar hasilnya lebih optimal. Beberapa kondisi yang perlu diperhatikan selama hidrolisis yaitu suhu, pH dan lama hidrolisis (Meldstad, 2015).

Ikan sapu-sapu tergolong ikan dengan kandungan protein sedang sebesar 19,71% (Chaidir, 2001). Ikan sapu-sapu pada penelitian pendahuluan telah dimanfaatkan sebagai bahan baku pembuatan bakso ikan (Putri, 2001), otak-otak ikan (Mahdiah, 2002), camilan simping (Tarigan, 2004), empek-empek (Trisnawati, 2007), dan keripik ikan (Tunjungsari, 2007). Penelitian mengenai pemanfaatan ikan sapu-sapu sebagai bahan hidrolisat protein ikan masih terbatas, sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut. Penelitian ini dilakukan dengan perlakuan pH dan lama hidrolisis yang berbeda untuk menentukan kondisi hidrolisis yang



optimal sehingga diketahui karakteristik hidrolisat protein ikan sapu-sapu (*Pterygoplichthys pardalis*) yang dihasilkan.

## 1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana karakteristik hidrolisat protein ikan sapu-sapu (*Pterygoplichthys pardalis*) menggunakan pH dan lama hidrolisis yang berbeda?

## 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui hasil perlakuan terbaik dari kombinasi faktor pH dan lama hidrolisis berbeda serta mengetahui karakteristik hidrolisat protein ikan sapu-sapu (*Pterygoplichthys pardalis*) yang dihasilkan.

## 1.4 Hipotesis

Hipotesis pada penelitian ini yaitu karakteristik hidrolisat protein ikan sapu-sapu (*Pterygoplichthys pardalis*) dipengaruhi oleh pH dan lama hidrolisis yang berbeda.

## 1.5 Kegunaan

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi terkait karakteristik hidrolisat protein ikan sapu-sapu (*Pterygoplichthys pardalis*) menggunakan pH dan lama hidrolisis yang berbeda.

## 1.6 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari-Maret 2019 yang bertempat di Laboratorium Perekayasaan Hasil Perikanan, Laboratorium Hidrologi, Laboratorium Keamanan Hasil Pangan dan Laboratorium Nutrisi dan Pakan Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang. Pengujian asam amino dilakukan di Laboratorium Saraswanti Indo Genetech, Bogor.

## 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Ikan Sapu-Sapu (*Pterygoplichthys pardalis*)

Ikan sapu-sapu termasuk golongan *invasive species*, yang artinya mampu menjadi predator maupun kompetitor terhadap spesies ikan asli. Masalah yang sering dihadapi adalah hibridisasi yang berlimpah dari ikan sapu-sapu. Hibridisasi berlimpah ini dapat disebabkan karena adanya limbah domestik, dimana ikan sapu-sapu dapat hidup saat kandungan oksigen terlarut rendah. Hal tersebut menyebabkan ikan sapu-sapu dapat mendominasi suatu wilayah perairan. *Pterygoplichthys* adalah genus ikan sapu-sapu yang paling banyak dijumpai di Indonesia. Salah satu spesies ikan sapu-sapu adalah *Pterygoplichthys pardalis* (Qoyyimah *et al.*, 2016). *Pterygoplichthys pardalis* merupakan salah satu spesies Loricariidae berasal dari Amerika Selatan dan Amerika Tengah (Aksari *et al.*, 2016).

Ikan sapu-sapu, menurut Thirzano (2011), dikenal dengan nama ikan “cakar lumut” atau “tempel watu”. Ikan sapu-sapu biasa ditemui pada sungai-sungai kecil di Kota Blitar sebagai anak Sungai Brantas. Populasi ikan sapu-sapu berdampak negatif karena menjadi spesies invasif. Pada awal tahun 90-an, ikan sapu-sapu mulai ditemukan di sekitar Clangap atau pertemuan antara Sungai Brantas dengan ujung Sungai Rahu. Pada tahun 2013, populasi ikan sapu-sapu mulai meningkat di Sungai Rahu dan beberapa sungai kecil di Dusun Mronjo, Desa Kebonrejo, Kecamatan Selopuro, Kota Blitar. Ikan sapu-sapu yang berlimpah dapat menyingkirkan beberapa spesies ikan asli seperti ikan lele, nila, wader, tawes, gabus dan lainnya yang ada di Sungai Rahu. Ikan sapu-sapu juga memiliki kebiasaan menggali lubang di sepanjang tepian sungai sehingga meningkatkan sedimentasi dan membuat tanggul sungai tidak stabil. Ikan sapu-sapu sering

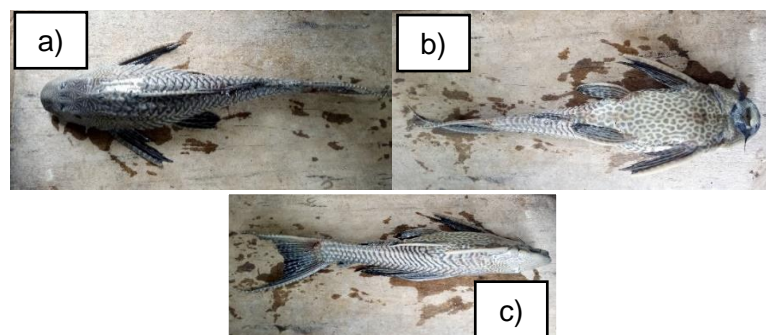
membuat kesal nelayan pencari ikan di Sungai Rahu karena biasa tersangkut pada jaring. Tekstur sisik yang keras dengan bentuk menyeramkan serta bau amis yang khas membuat ikan sapu-sapu kurang bisa dikonsumsi, hanya beberapa warga sekitar yang mampu mengolah dan mengonsumsi ikan ini dengan cara dikukus. Secara garis besar, ikan sapu-sapu sungai kurang laku di pasar sehingga tergolong sebagai ikan yang kurang bermanfaat.

### 2.1.1 Klasifikasi Ikan Sapu-Sapu (*Pterygoplichthys pardalis*)

Ikan sapu-sapu menurut Rao dan Sunchu (2017), diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Subfilum	: Vertebrata
Superkelas	: Osteichthyes
Kelas	: Actinopterygii
Subkelas	: Neopterygii
Infrakelas	: Teleostei
Superordo	: Ostariophysi
Famili	: Loricariidae
Genus	: <i>Pterygoplichthys</i>
Spesies	: <i>Pterygoplichthys pardalis</i>

Ikan sapu-sapu (*Pterygoplichthys pardalis*) yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 1.



**Gambar 1.** Sampel Ikan Sapu-Sapu (*Pterygoplichthys pardalis*) : a) Tampak Atas; b) Tampak Bawah; c) Tampak Samping (Sumber: Dokumentasi Pribadi, 2019)

### 2.1.2 Morfologi Ikan Sapu-Sapu (*Pterygoplichthys pardalis*)

Ikan sapu-sapu (*Pterygoplichthys pardalis*) tubuhnya berbentuk pipih dorso ventral dan tertutup kulit keras, kepalanya memiliki pola garis gelap terang secara geometris, mulut subterminal sebagai tipe penyaring dan penghisap (Aksari *et al.*, 2016). Perut ikan sapu-sapu (*Pterygoplichthys pardalis*) tidak ditutupi oleh sisik keras, mulutnya terletak di kepala bagian bawah dengan bentuk cakram. *Adipose fin* ikan sapu-sapu umumnya berduri. Semua siripnya diawali dengan jari-jari yang keras kecuali sirip ekor, sirip bagian punggung dapat melebar, warna tubuhnya coklat atau abu-abu bahkan hitam dengan dominasi bintik-bintik hitam (Kotella *et al.*, 1993).

*Pterygoplichthys pardalis* memiliki tubuh yang sangat keras karena ditutupi dengan lempeng bertulang. Spesies ini ditandai dengan garis-garis putih di kepala dan pola heksagonal pada tubuh. Mulut penghisap ventral berbentuk segitiga dengan gigi-gigi halus yang membantu melekat pada permukaan. Perut datar dibagian bawah dan memiliki pola bintik atau garis gelap dengan latar belakang terang. Sirip perut menyentuh anus dan sirip dubur memanjang hingga di bawah sirip adiposa (Rao dan Sunchu, 2017).

### 2.1.3 Habitat Ikan Sapu-Sapu (*Pterygoplichthys pardalis*)

*Pterygoplichthys pardalis* biasa disebut dengan ikan sapu-sapu *pleco* atau *leopard pleco*. Ikan ini adalah spesies asli Lembah Sungai Amazon Brazil dan Peru. Mereka dapat hidup dalam perairan dengan kandungan oksigen terlarut yang rendah, walaupun tergolong ikan demersal tetapi seringkali menghirup udara ke permukaan saat air mulai mengering. Ikan *Pterygoplichthys pardalis* sering dibudidayakan untuk perdagangan karena dapat dimanfaatkan sebagai pembersih alami akuarium. Di alam bebas, ikan ini dapat hidup dalam perairan tropis dan subtropis, seringkali perkembangannya yang cepat dan pesat menyebabkan

repository.ub.ac.id

masalah invasi yang tidak terkendali dan berdampak pada lingkungan perairan (Rao dan Sunchu, 2017).

*Pterygoplichthys pardalis* menggunakan sistem pernapasan brankialis saat oksigen terlarut normal, tetapi saat kandungan oksigen terlarut menurun mereka menggunakan lambung sebagai organ pernapasan dengan mengambil udara ke permukaan. Ikan ini telah mengembangkan adaptasi fisiologis yang membuatnya sangat toleran terhadap lingkungan yang tidak ramah bagi sebagian besar ikan teleostei, seperti air asam dengan kandungan O<sub>2</sub> rendah dan CO<sub>2</sub> tinggi. Mereka yang secara tidak sengaja dilepaskan ke sungai akan menghasilkan beberapa dampak negatif sebagai *Invasive Alien Species* (IAS) yang berdampak buruk pada lingkungan, ekonomi dan kesehatan manusia (Moroni *et al.*, 2015).

#### 2.1.4 Kandungan Gizi Ikan Sapu-Sapu (*Pterygoplichthys pardalis*)

Perbedaan spesies, habitat, umur dan kebiasaan makan ikan akan berpengaruh pada kandungan gizi yang dihasilkan. Berdasarkan penelitian sebelumnya oleh Chaidir (2001), ikan sapu-sapu yang diperoleh dari Waduk Cirata memiliki kandungan protein sedang (15-20%) dan kandungan lemak rendah (<5%). Ikan sapu-sapu dari Waduk Cirata memiliki kadar merkuri yang masih berada pada tingkatan aman untuk dikonsumsi, karena jauh dari ambang batas ketetapan Departemen Kesehatan RI dan WHO, yaitu batas maksimum merkuri sebesar 0,5 mg/kg. Hasil kandungan gizi ikan sapu-sapu dari Waduk Cirata lebih lengkap tersedia pada Tabel 1.

**Tabel 1.** Kandungan Gizi Ikan Sapu-Sapu dari Waduk Cirata

No	Jenis Uji	Kadar
1	Air	77,50 %
2	Abu	1,01 %
3	Lemak	1,23 %
4	Protein	19,71 %
5	Karbohidrat	1,00 %

Sumber : Chaidir (2001).

Ikan dapat digolongkan berdasarkan kandungan lemak dan kandungan proteinnya dengan ketentuan pada Tabel 2.

**Tabel 2.** Penggolongan Ikan Berdasarkan Kandungan Lemak dan Protein

No	Kadar Lemak (%)	Kadar Protein (%)
Lemak rendah-protein sedang	<5	15-20
Lemak sedang-protein sedang	5-15	15-20
Lemak tinggi-protein rendah	>15	<15
Lemak rendah-protein tinggi	<5	>20
Lemak rendah-protein rendah	<5	<15

Sumber : Stansby dan Olcott (1963).

Protein ikan dapat diklarifikasikan menjadi protein sarkoplasma sebesar 20-30%, protein miofibril sebesar 65-75% dan protein stroma atau jaringan ikat sebesar 1-3%. Protein miofibril larut dalam larutan garam, terdiri dari aktin, miosin, dan aktomiosin. Protein miofibril dapat membentuk gel dan mengalami proses koagulasi sehingga banyak dimanfaatkan sebagai pengemulsi. Protein sarkoplasma larut dalam air tetapi tidak larut dalam larutan garam, protein ini dapat melekat pada protein miofibril saat pemanasan sehingga dapat mencegah pembentukan gel selama pemasakan daging. Protein stroma tidak dapat diekstrak oleh larutan asam, basa ataupun garam tetapi mudah dilarutkan oleh panas.

## 2.2 Hidrolisat Protein Ikan (HPI)

Hidrolisat protein ikan merupakan produk yang dihasilkan dari penguraian protein ikan menjadi peptida sederhana dan asam amino melalui proses hidrolisis oleh enzim, asam, atau basa (Latifah, 2013). Hidrolisat protein adalah produk yang mengkonversi protein menjadi peptida yang lebih kecil. Hidrolisat protein adalah fragmen kecil peptida yang mengandung 2-20 asam amino (Chalamaiah *et al.*, 2012). Hidrolisat protein ikan termasuk pada golongan konsentrat protein. Konsentrat protein ikan adalah bentuk produk yang dibuat dengan cara memisahkan lemak dan air dari tubuh ikan yang merupakan "*stable protein*" dari ikan untuk dikonsumsi manusia bukan makanan ternak dan dengan kandungan proteinnya lebih dipekatkan dari pada bahan bakunya (Dewita dan Syahrul 2010).



Hidrolisat protein ini dihasilkan oleh hidrolisis protein asli. Hidrolisis protein mengurangi ukuran peptida, dan dengan demikian menjadikan hidrolisat sebagai sumber asam amino (Chalamaiah *et al.*, 2012). Hidrolisis protein menggunakan enzim merupakan cara yang efisien karena dapat menghasilkan hidrolisat protein yang terhindar dari kerusakan asam amino tertentu yaitu triptofan dan glutamin (Latifah, 2013). Sifat enzim yang spesifik menyebabkan pemilihan kondisi hidrolisis harus tepat agar hasilnya lebih optimal, beberapa kondisi yang perlu diperhatikan seperti suhu, pH dan waktu hidrolisis (Gesualdo dan Li-Chan, 1999).

Hidrolisat protein ikan menghasilkan peptida dengan aktivitas antioksidan dapat dilepaskan dari protein ikan setelah hidrolisis enzimatik. Peptida antioksidan ini tidak aktif dalam urutan molekul protein prekursor tetapi dapat dilepaskan setelah hidrolisis enzimatik. Hidrolisat atau peptida protein antioksidan dapat diproduksi dari sumber protein ikan dengan menggunakan berbagai proses seperti hidrolisis enzimatik *in vitro*, proses autolitik menggunakan enzim endogen, fermentasi mikroba, dan simulasi pencernaan lambung (Nazeer *et al.*, 2011).

### **2.2.1 Hidrolisis Enzimatis**

Hidrolisis enzimatik protein ikan dapat dilakukan dengan enzim endogen yang sebagian besar berasal dari saluran pencernaan dan hati melalui proses autolisis, atau penambahan enzim eksogen untuk mendorong proses hidrolisis. Banyak enzim berasal dari mikroba, tumbuhan dan hewan telah digunakan dalam hidrolisis protein ikan, termasuk enzim komersial papain, Alcalase®, bromelain, Protamex™, dan lainnya (Souissi *et al.*, 2007).

Hidrolisis enzimatik dapat dikontrol oleh pemilihan jenis enzim yang tepat, kondisi dan lama hidrolisis. Proses hidrolisis menyebabkan penurunan ukuran peptida, yang dapat meningkatkan sifat fungsional protein, kualitas, dan karakteristiknya. Sifat fungsional hidrolisat protein ikan tergantung pada banyak



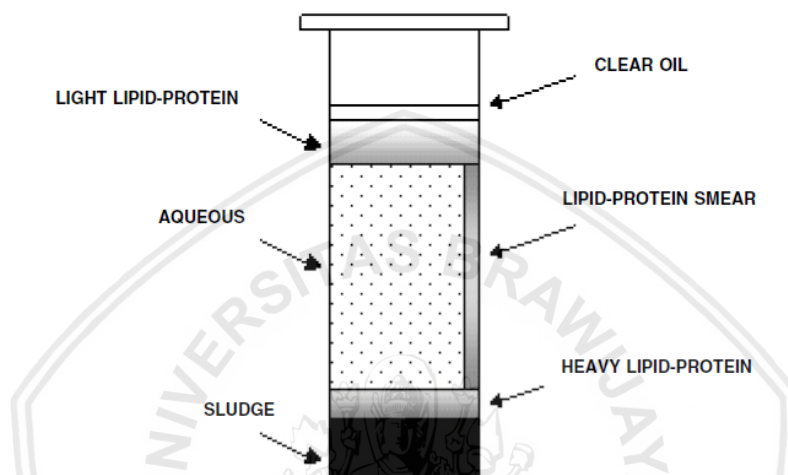
faktor, termasuk metode pengolahan yang digunakan, karakteristik bahan baku, dan tingkat hidrolisis. Terdapat beberapa kelemahan dalam menggunakan enzim untuk proses hidrolisis hidrolisat protein ikan yang diproduksi untuk skala industri. Salah satu kelemahan hidrolisis enzimatik dari bahan baku limbah ikan atau ikan yang kurang bermanfaat adalah harga yang relatif tinggi dari enzim komersial. Masalah lainnya adalah tantangan dalam mengendalikan proses hidrolisis untuk mendapatkan hasil dan produk yang seragam dengan kualitas dan karakteristik yang sama. Hasil protein juga bervariasi dalam metode ini dan tergantung pada berbagai faktor. Penggunaan enzim endogen yang berasal dari saluran pencernaan ikan menjadi salah satu solusi dalam menghadapi masalah ini. Para peneliti berusaha menemukan kondisi optimal dalam memproduksi hidrolisat protein ikan menggunakan enzim endogen (Meldstad, 2015).

### **2.2.2 Proses Hidrolisis**

Proses hidrolisis menggunakan satu atau lebih protease umumnya melibatkan persiapan bahan baku, penambahan air, penambahan enzim atau digunakan enzim endogen, penyesuaian suhu optimal enzim, dan pemisahan fraksi. Setelah hidrolisis, suspensi partikel yang berbeda diperoleh tetapi tergantung pada bahan bakunya. Campuran dipisahkan menjadi beberapa fraksi menggunakan sentrifugasi, ultrafiltrasi, nanofiltrasi, atau pengayakan (Meldstad, 2015).

Pemisahan fraksi bermanfaat untuk mendapatkan hidrolisat sebagai fraksi terlarut serta memisahkannya dari fraksi lemak dan fraksi kasar. Sentrifugasi adalah praktik paling umum untuk memisahkan fraksi-fraksi ini. Sentrifugasi menggunakan gaya sentrifugal untuk mendorong pengendapan partikel dengan kepadatan berbeda dalam campuran padat-cair. Lima fraksi utama yang berbeda dapat dibentuk dalam cuvet selama sentrifugasi tergantung pada komposisi bahan

baku. Lapisan yang terbentuk biasanya meliputi fraksi partikel kasar, fraksi lumpur/partikel halus, fraksi air di tengah (mengandung protein hidrolisat), fraksi protein-lipid (*light lipo-protein*) dan paling atas merupakan fraksi minyak (Slizyte, 2004). Pemisahan fraksi setelah proses sentrifugasi terlihat seperti pada Gambar 2.



**Gambar 2.** Lapisan Fraksi  
(Sumber: Kristinsson dan Rasco, 2000)

Tujuan fraksinasi dalam proses hidrolisis yaitu untuk memperoleh senyawa yang diinginkan dengan kemurnian maksimum. Pemisahan sentrifugasi dapat optimal tergantung pada ukuran, bentuk atau kerapatan partikel, viskositas serta kecepatan rotasi (Meldstad, 2015).

### 2.2.3 pH dan Lama Hidrolisis

Enzim bekerja secara spesifik dan memiliki pH optimal yang berbeda-beda untuk tiap enzimnya. Enzim merupakan protein yang sensitif terhadap perubahan pH. pH yang terlalu tinggi atau terlalu rendah dapat menyebabkan denaturasi enzim, sehingga diperlukan kondisi pH optimum untuk menunjang kinerja enzim. Enzim endogen pada saluran pencernaan biasanya bekerja optimum pada kisaran pH 6-8 (Reed, 1975). Pengaruh pH yang optimum ditambah dengan pengaturan substrat dan temperatur yang sesuai dapat mempercepat reaksi pemecahan

peptida-peptida pada produk hidrolisat protein yang dibuat. Kinerja dari enzim protease yang digunakan berpengaruh terhadap kualitas hidrolisat yang didapat. Tanpa adanya pH yang sesuai maka kinerja enzim protease tidak akan berjalan dengan lancar dan proses hidrolisis akan berlangsung lebih lama (Utomo *et al.*, 2014).

Semakin lama waktu hidrolisis maka kandungan asam amino bebas yang dihasilkan cenderung meningkat karena terjadi pemecahan senyawa protein yang lebih sempurna (Indrawaty, 1983). Namun, laju hidrolisis akan mencapai fase stasioner hingga fase menurun ketika tidak ada lagi proses hidrolisis oleh enzim karena substrat tidak lagi tersedia untuk berinteraksi dengan enzim (Shahidi *et al.*, 1995). Pada aktivitas antioksidan, pengurangan waktu inkubasi ketika hidrolisis menurunkan peluang terjadinya oksidasi lipid dan juga menurunkan efek penghambatan peroksidasi terhadap protolisis (Zamora dan Hidalgo, 2001).

#### **2.2.4 Metode Pembuatan Hidrolisat Protein Ikan**

Pembuatan hidrolisat protein ikan telah dilakukan oleh Nurdiani *et al.* (2015), sampel yang digunakan berupa limbah ikan Salmon Atlantik menggunakan enzim endogen. Sampel ikan dipotong kecil-kecil dan digiling tanpa menambahkan akuades. Sampel sebagian digunakan untuk uji proksimat. Ikan cincang yang tersisa kemudian dicampur dengan akuades untuk mendapatkan perbandingan ikan : akuades 1: 1, 1: 2 atau 1: 3 (b/b). Campuran dihidrolisis selama 18 jam pada suhu yang berbeda (4°C, suhu kamar dan 50°C). Sampel yang telah dihidrolisis kemudian disentrifugasi pada 2055 g selama 10 menit pada suhu 20°C untuk memisahkan 5 fraksi yang berbeda. Lima fraksi yang terbentuk setelah sentrifugasi adalah lapisan minyak, fraksi lipoprotein terang, fraksi protein terlarut, fraksi partikel halus dan fraksi partikel kasar di bagian bawah. Semua fraksi kemudian dipisahkan, ditimbang dan dianalisis kadar protein, kecuali fraksi minyak.

Hidrolisat protein ikan pada penelitian Nalinanon *et al.* (2011) terbuat dari sampel otot ikan kurisi (*Nemipterus hexodon*) dengan enzim pepsin dari pencernaan ikan cakalang. Sampel dihaluskan selama 2 menit menggunakan blender berkecepatan maksimal, lalu ditambahkan delapan volume akuades bersuhu 0-6°C. Penyesuaian pH menjadi 2 dengan menambahkan HCl 1 M. Sampel kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5000 g selama 10 menit pada suhu 4°C. Hasil sentrifugasi membentuk lapisan atas (minyak), lapisan tengah (protein terlarut) dan lapisan bawah (jaringan ikat dan membran lemak tidak larut). Lapisan dipisahkan, lapisan atas dan bawah dibuang sementara lapisan tengah yang dihasilkan sebagai hidrolisat protein ikan.

### 2.2.5 Manfaat Hidrolisat Protein Ikan

Hidrolisat protein yang dihasilkan dari protein ikan adalah suplemen nutrisi yang baik sebagai senyawa bioaktif dan dapat dengan mudah diserap dan dimanfaatkan untuk berbagai aktivitas metabolisme (Nesse *et al.*, 2011). Penggunaan produk bioaktif alami (makanan fungsional/nutrasetika) di antara masyarakat umum mulai meningkat, mereka menggunakannya sebagai suatu upaya pencegahan dan pengobatan berbagai kondisi termasuk gangguan pencernaan (Marchbank *et al.*, 2008).

Hidrolisat protein ikan dapat berfungsi sebagai pendukung struktur lapisan usus dan meningkatkan kesehatan usus. Hidrolisat protein ikan direkomendasikan sebagai suplemen makanan untuk keseimbangan kolesterol, pengendalian stres, meningkatkan kesehatan jantung, serta menurunkan tekanan darah dengan menghambat enzim ACE. Hidrolisat protein ikan dapat mendukung fungsi vaskular aliran darah yang optimal dan tekanan darah yang normal (Chalamaiah *et al.*, 2012).

Pemanfaatan hidrolisat protein ikan sebagai suplemen makanan diharapkan dapat membantu mengurangi stress oksidatif sebagai antioksidan dan membantu stabilisasi glukosa darah. Suplemen makanan berasal dari hidrolisat protein ikan juga digunakan untuk melawan gejala pada gangguan berat badan, tekanan darah, masalah tidur, kesulitan konsentrasi dan masalah suasana hati. Fungsi lainnya yaitu mendukung respons tubuh terhadap stres dan memberikan dukungan nutrisi untuk fungsi memori dan kognitif (Guerard *et al.*, 2010). Nutrisi olahraga (mendukung anabolisme otot tubuh dan pemulihan metabolisme) (Nesse *et al.*, 2011). Suplemen makanan membantu untuk mendukung sel-sel di saluran pencernaan dan mengatur fungsi usus (Marchbank *et al.*, 2008).

Hidrolisat protein bermanfaat sebagai antioksidan karena terbentuknya peptida-peptida terlarut. Peptida antioksidan ini tidak aktif dalam urutan molekul protein prekursor tetapi dapat dilepaskan setelah hidrolisis enzimatis. Hidrolisat atau peptida antioksidan dapat diproduksi dari sumber protein ikan dengan menggunakan berbagai proses seperti hidrolisis enzimatis *in vitro*, proses autolitik menggunakan enzim endogen, fermentasi mikroba, dan enzim pencernaan lambung (Ren *et al.*, 2008). Selama hidrolisis, pembelahan ikatan peptida memungkinkan pelepasan peptida aktif yang mampu menyerap radikal bebas, mengkelat ion logam prooksidasi dan menghambat peroksidasi lipid dalam sistem pangan (You *et al.*, 2010).

Dilaporkan bahwa peptida antioksidan memiliki beberapa kelasi logam atau aktivitas donor elektron positif pada atom hidrogen, sehingga memungkinkan terjadinya interaksi dengan radikal bebas dan menghentikan reaksi berantai radikal atau mencegah pembentukannya (Ren *et al.*, 2008). Oleh karena itu, konstituen asam amino dan urutan peptida sangat penting untuk aktivitas antioksidan. Penelitian menunjukkan bahwa asam amino hidrofobik dan satu atau lebih residu Histidin, Prolin, Metionin, Sistein, Tirosin, Tryptophan, dan Fenilalanin

dapat meningkatkan aktivitas peptida antioksidan (You *et al.*, 2010). Kehadiran urutan hidrofobik dalam peptida dapat berinteraksi dengan molekul lipid dan dapat menyumbangkan proton pada radikal turunan lipid (Je *et al.*, 2007). Potensi antioksidan dari hidrolisat protein tergantung pada komposisi asam amino (Elias *et al.*, 2008).

### 2.3 Karakteristik Hidrolisat Protein Ikan

Kandungan gizi hidrolisat protein ikan yang dijual secara komersil menurut *International Quality Ingredients* (2019) harus memenuhi persyaratan mutu komposisi proksimat dalam basis basah (bb) atau basis kering (bk) sebagaimana tercantum pada Tabel 3.

**Tabel 3.** Persyaratan Mutu Hidrolisat Protein Ikan Komersil

Parameter	Hidrolisat Protein Ikan Komersil (%bb)	Hidrolisat Protein Ikan Komersil (%bk)
Kadar air	3,00-5,00	-
Kadar abu	4,00-7,00	4,12-7,37
Kadar protein	73,00-75,00	75,26-78,95
Kadar lemak	19,00-22,00	19,59-23,16

Sumber : *International Quality Ingredients* (2019).

Kandungan protein tinggi yang dilaporkan untuk hidrolisat protein ikan disebabkan oleh terlarutnya protein selama hidrolisis dan hilangnya zat padat yang tidak larut dengan sentrifugasi. Kandungan lemak yang rendah dari hidrolisat protein ikan karena penghapusan lipid dengan fraksi protein yang tidak larut oleh sentrifugasi (Chalamaiah *et al.*, 2012). Kadar air yang rendah dari hidrolisat protein terkait dengan jenis sampel dan suhu tinggi yang digunakan selama proses penguapan dan pengeringan. Selama proses ini, sampel kehilangan sebagian besar kadar airnya (Bueno-Solano *et al.*, 2009). Kandungan abu yang relatif tinggi dari hidrolisat protein ikan karena penggunaan asam atau basa yang ditambahkan untuk penyesuaian pH (Pacheco-Aguilar *et al.*, 2008).

Proses hidrolisis pada pembuatan hidrolisat protein memiliki tujuan untuk memutus ikatan peptida protein sehingga bentuknya lebih sederhana berupa asam



amino dan peptida. Analisis asam amino bertujuan untuk mengetahui jenis dan jumlah asam amino esensial yang terkandung didalamnya (Meldstad, 2015). Hidrolisat protein ikan komersil menurut *International Quality Ingredients* (2019) setidaknya harus memenuhi standar asam amino sesuai Tabel 4.

**Tabel 4.** Persyaratan Asam Amino Hidrolisat Protein Ikan Komersil

<b>Asam Amino</b>	<b>Hidrolisat Protein Ikan Komersial (%)</b>
Alanin	6,50
Arginin	7,10
Asam Aspartat	8,80
Asam Glutamat	13,50
Fenilalanin	3,70
Glisin	11,10
Histidin	2,10
Isoleusin	4,30
Leusin	7,10
Lisin	7,50
Metionin	2,90
Prolin	5,60
Serin	4,90
Sistein	-
Tirosin	-
Treonin	3,90
Triptofan	-
Valin	4,90

Sumber : *International Quality Ingredients* (2019).



### 3. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Materi Penelitian

##### 3.1.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan untuk pembuatan hidrolisat protein ikan sapu-sapu adalah *coolbox*, ember, pisau, telenan, baskom, mesin selep daging, *freezer*, *beaker glass* 500 mL, timbangan digital, gelas ukur, *washing bottle*, spatula, mortar dan alu, pH meter, pipet serologis 1 mL, pipet volume 10 mL, pipet tetes, bola hisap, labu ukur 250 dan 100 mL, cuvet sentrifuge, sentrifuge, botol vial, botol sampel, nampan dan kulkas.

Alat yang digunakan untuk analisa hidrolisat protein ikan sapu-sapu terdiri dari alat untuk uji antioksidan yaitu mikropipet, botol vial, nampan, spektrofotometer UV-VIS, cuvet kaca, dan *washing bottle*. Alat analisa DH dan kadar protein yaitu labu kjeldahl, mesin destruksi, destilator, erlenmeyer, gelas ukur, pipet tetes, *beaker glass*, timbangan analitik, bola hisap, statis, buret, pipet volume 10 mL, sentrifuge dan cuvet. Alat untuk analisa kadar air dan abu yaitu oven, cawan porselen, *crustable tang*, loyang, nampan, desikator, timbangan digital, dan tanur. Alat untuk analisa kadar lemak yaitu kondensor, labu ekstraksi, soxhlet, *waterbath*, timbangan digital, gelas ukur, *beaker glass*, desikator dan oven. Alat untuk analisa berat molekul metode SDS-PAGE adalah kompor, panci, microwave, kulkas, *freezer*, pipet tetes, mikro pipet, *power supply* dan seperangkat alat elektroforesis.

##### 3.1.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam pembuatan hidrolisat protein ikan adalah ikan sapu-sapu (*Pterygoplichthys pardalis*) yang diambil dari keramba jaring milik warga di Dusun Mronjo, Desa Kebonrejo, Kecamatan Selopuro, Kota Blitar. Bahan

lainnya yaitu es curai, plastik, kertas label, tisu, akuades, *aluminium foil*, NaOH 6 N, dan HCl 6 N.

Bahan yang digunakan untuk analisa hidrolisat protein ikan sapu-sapu terdiri dari bahan untuk uji antioksidan yaitu sampel, methanol, DPPH 0,075 mM, kapas, tisu, akuades, *aluminium foil*, alkohol, dan asam askorbat. Bahan untuk analisa DH dan kadar protein yaitu sampel protein terlarut, TCA 20%, tablet kjeldahl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, akuades, NaOH, *methyl orange*, boraks, HCL 0,01 N, plastik, kertas label dan tisu. Bahan untuk analisa kadar air dan abu yaitu sampel kering hasil *spray dryer*. Bahan untuk analisa kadar lemak yaitu kertas saring, benang kasur, petroleum eter, dan sampel kering hasil *spray dryer*. Bahan untuk analisa berat molekul metode SDS-PAGE yaitu trisbase, HCL 6 N, akuabides, *acrylamide*, N'N'-bis-methylene-acrylamide, *glycine*, SDS, APS, TEMED, metanol, asam asetat glasial *commasie brilliant blue R-250*, plastik wrap, tisu, alkohol dan *aluminium foil*.

## **3.2 Metode Penelitian**

### **3.2.1 Metode**

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen laboratoris. Metode eksperimen dipilih karena dianggap mampu menguji hipotesis yang berhubungan dengan sebab akibat dengan kondisi terkontrol dan memiliki validitas keilmiah yang dapat dipercaya. Eksperimen, didefinisikan oleh Kerlinger (1973), yaitu suatu penelitian yang bersifat ilmiah dimana terdapat satu atau lebih variabel bebas yang dapat dikontrol maupun dimanipulasi oleh peneliti dan terdapat beberapa variabel terikat yang diamati sehingga menemukan variasi yang muncul bersamaan dengan manipulasi variabel bebas tersebut. Pada umumnya metode penelitian eksperimen, menurut Jaedun (2011), digunakan

untuk penelitian bersifat laboratoris, walau tidak menutup kemungkinan dapat digunakan dalam penelitian sosial dan penelitian pendidikan.

### 3.2.2 Variabel Penelitian

Variabel merupakan gejala yang menghasilkan data dengan nilai bervariasi dan dapat berubah-ubah. Penelitian eksperimen menurut Jaedun (2011), dapat memunculkan jenis-jenis variabel sebagai berikut:

- Variabel independen/bebas : Variabel yang memberikan pengaruh (variabel eksperimen/perlakuan) pada variabel dependen/terikat atau variabel dampak.
- Variabel dependen/terikat : Variabel yang muncul sebagai (variabel dampak) akibat/dampak/hasil adanya variabel independen/bebas.
- Variabel kontrol (variabel pengendali) : Variabel yang dapat berpengaruh pada variabel terikat, tetapi pengaruhnya akan dikendalikan secara terkontrol melalui pengembangan penelitian atau secara statistik.

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini adalah variabel bebas, variabel terikat dan variabel terkontrol. Variabel bebas dalam penelitian pendahuluan yaitu perbandingan sampel dan akuades, sementara pada penelitian utama meliputi pH dan lama hidrolisis pada pembuatan hidrolisat protein ikan sapu-sapu (*Pterygoplichthys pardalis*). Variabel terikat meliputi karakteristik hidrolisat protein ikan sapu-sapu (*Pterygoplichthys pardalis*) yang dihasilkan berdasarkan rendemen, derajat hidrolisis, aktivitas antioksidan, proksimat, berat molekul, dan asam amino. Variabel terkontrol meliputi pembuatan hidrolisat protein

ikan sapu-sapu (*Pterygoplichthys pardalis*) tanpa penambahan akuades saat penelitian pendahuluan dan tanpa penyesuaian pH pada penelitian utama.

### 3.3 Rancangan Penelitian

#### 3.3.1 Rancangan Penelitian Pendahuluan

Penelitian pendahuluan dilakukan untuk mengetahui perbandingan terbaik sampel dan akuades (b/v). Perlakuan yang dilakukan ada 4 yaitu perbandingan sampel : akuades = 1:0 (kontrol); 1:1 ; 1:2 ; 1:3 (b/v). Perlakuan terbaik didasarkan pada rendemen dan aktivitas antioksidan tertinggi. Penelitian pendahuluan ini menggunakan analisa data Rancangan Acak Lengkap (RAL) sederhana dengan 4 perlakuan dan 3 kali ulangan, sehingga didapatkan 12 satuan perlakuan. Kombinasi perlakuan dan ulangan pada penelitian pendahuluan ini dapat dilihat pada Tabel 5.

**Tabel 5.** Kombinasi Perlakuan dan Ulangan pada Penelitian Pendahuluan

Perlakuan Perbandingan Sampel (g) : Akuades (mL)	Ulangan			Total	Rata-rata
	1	2	3		
1 : 0 (Kontrol)					
1 : 1					
1 : 2					
1 : 3					

Penelitian pendahuluan menggunakan analisis data statistik yaitu analisis sidik ragam (ANOVA) pada taraf 5% menggunakan Minitab 18. Jika ditemukan perbedaan yang nyata maka akan dilanjutkan dengan Uji Tukey.

#### 3.3.2 Rancangan Penelitian Utama

Penelitian utama dilakukan dengan menggunakan hasil rasio antara sampel dan pengencer terbaik dari penelitian pendahuluan. Kemudian menerapkan beberapa kondisi yang terkontrol pada masing-masing perlakuan. Proses pembuatan hidrolisat protein didasari oleh aktivitas enzim protease endogen yang ada pada sampel yang mengakibatkan terjadinya hidrolisis dan pemutusan ikatan peptida. Analisa data dalam penelitian utama ini menggunakan

Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial dengan 2 faktor. Faktor pertama dalam penelitian utama yaitu variasi pH (5, 7 dan 9) serta perlakuan kontrol tanpa mengubah pH bahan baku (pH 6,4), sedangkan faktor kedua yaitu variasi lama hidrolisis (12 dan 24 jam). Penjelasan untuk tiap perlakuan berdasarkan kedua faktor sebagai berikut :

a) Faktor pertama adalah pH hidrolisis dengan 3 perlakuan, yaitu:

A1 = 5

A3 = 9

A2 = 7

A4 = pH bahan baku 6,4 (kontrol)

b) Faktor kedua adalah lama hidrolisis dengan 2 perlakuan, yaitu:

B1 = 12 jam

B2 = 24 jam

Ulangan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu 3 kali ulangan berdasarkan perhitungan dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$(n-1)(r-1) \geq 15$

$(8-1)(r-1) \geq 15$

$7r-7 \geq 15$

$7r \geq 22$

$r \approx 3$

Dimana:

n : Banyaknya perlakuan

r : Ulangan yang dilakukan

15 : derajat bebas

Jadi, penelitian ini menggunakan r (ulangan) sebanyak 3 kali, sehingga didapatkan total 24 satuan perlakuan. Kombinasi perlakuan dan ulangan dalam penelitian utama ini dapat dilihat pada Tabel 6.

**Tabel 6.** Kombinasi Perlakuan dan Ulangan dalam Penelitian Utama

pH Hidrolisis	Lama Hidrolisis (Jam)	Ulangan			Total	Rata-rata
		1	2	3		
5	12					
	24					
7	12					
	24					
9	12					
	24					
Kontrol	12					
	24					



Data yang didapatkan kemudian dibandingkan antara F hitung dengan F tabel sesuai pedoman berikut:

- Jika  $F_{hitung} < F_{tabel\ 5\%}$ , maka perlakuan tidak berbeda nyata.
- Jika  $F_{tabel\ 5\%} < F_{hitung} < F_{tabel\ 1\%}$ , maka perlakuan berbeda nyata.
- Jika  $F_{hitung} > F_{tabel\ 1\%}$ , maka perlakuan sangat berbeda nyata.

Perhitungan dengan hasil berbeda nyata ( $F_{hitung} > F_{tabel\ 5\%}$ ) maka dilakukan uji lanjut Tukey pada taraf 5% dengan aplikasi Minitab 18 untuk menentukan perlakuan terbaik. Penentuan perlakuan terbaik menggunakan *Response Surface Method* (RSM) yang disajikan dalam *contour plot* dari hasil beberapa parameter menggunakan aplikasi Minitab 18.

### 3.4 Prosedur Penelitian

Pada penelitian ini, prosedur yang digunakan terdiri dari 3 tahap yaitu preparasi sampel, penelitian pendahuluan, dan penelitian utama. Preparasi sampel merupakan tahap awal penelitian dimana pada tahap ini dilakukan penggilingan sampel ikan sapu-sapu (*Pterygoplichthys pardalis*) hingga halus. Penelitian pendahuluan meliputi pencarian perbandingan terbaik sampel dan akuades (b/v). Penelitian utama meliputi pembuatan hidrolisat protein ikan sapu-sapu (*Pterygoplichthys pardalis*) dengan perlakuan pH dan lama hidrolisis yang berbeda dari hasil penelitian pendahuluan terbaik.

#### 3.4.1 Preparasi Sampel

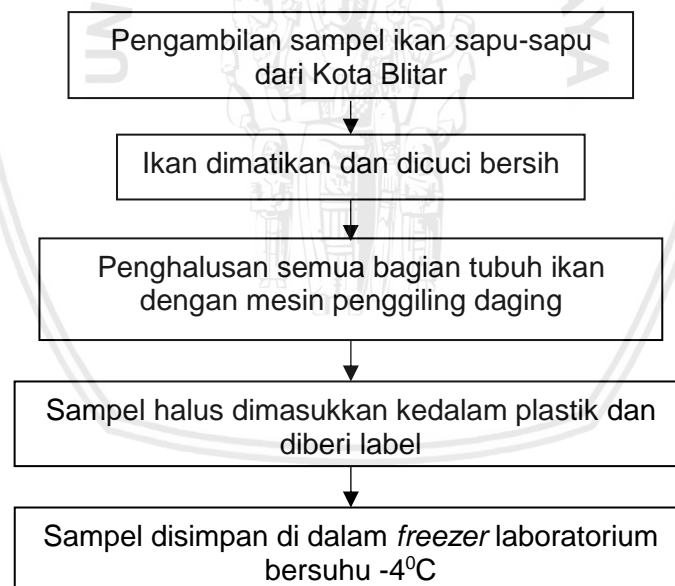
Preparasi sampel diawali dengan pengambilan sampel ikan sapu-sapu (*Pterygoplichthys pardalis*) dari keramba jaring apung milik salah satu warga di Dusun Mronjo, Desa Kebonrejo, Kecamatan Selopuro, Kota Blitar. Ikan sapu-sapu ini diduga berasal dari Sungai Brantas karena air di keramba jaring apung berasal dari aliran anak Sungai Brantas. Proses pengambilan sampel ikan sapu-sapu terlihat pada Gambar 3.





**Gambar 3.** Pengambilan Sampel di Kota Blitar  
(Sumber: Dokumentasi Pribadi, 2019)

Ikan sapu-sapu selanjutnya dicuci bersih lalu semua bagian tubuhnya dicacah dan digiling dengan menggunakan mesin penggiling daging di Pasar Landungsari, Dau, Kota Malang. Sampel halus diberi label dan dimasukkan kedalam *freezer* Laboratorium Hidrobiologi, Divisi Sumberdaya Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya. Preparasi sampel dilakukan sesuai dengan diagram alir pada Gambar 4.



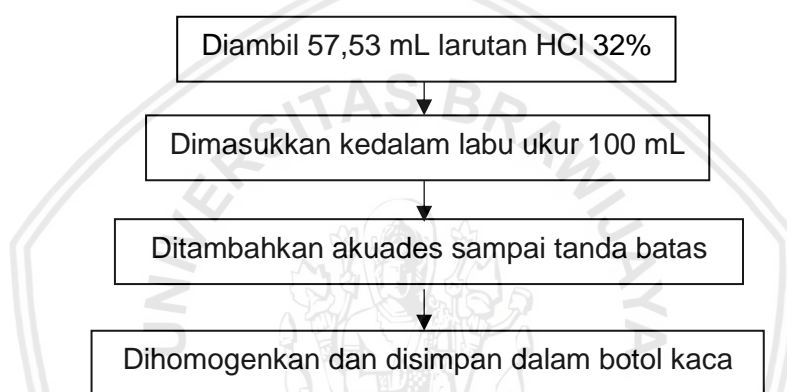
**Gambar 4.** Diagram Alir Preparasi Sampel

Proses selanjutnya juga dilakukan preparasi larutan asam dan basa. Larutan asam dan basa akan digunakan untuk penyesuaian pH hirolisis dalam penelitian pendahuluan dan penelitian utama.



- **Preparasi Larutan Asam (Wijaya, 2001 dengan Modifikasi)**

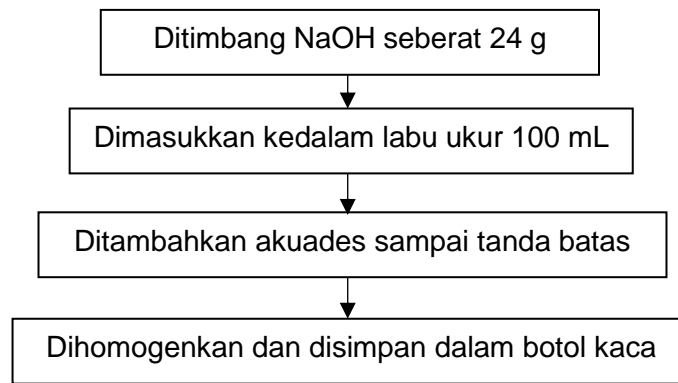
Pembuatan HCl 6 N diawali dengan menyiapkan larutan HCl pekat 32%, pengenceran akan dilakukan dalam 100 mL akuades. HCl 32% diambil sebanyak 57,53 mL menggunakan pipet volume kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan akuades sampai tanda batas. Larutan dihomogenkan lalu disimpan kedalam botol kaca dan diamankan pada lemari penyimpanan. Diagram alir pembuatan larutan HCl 6 N sesuai dengan Gambar 5. Perhitungan dalam pembuatan larutan dapat dilihat pada Lampiran 10.



**Gambar 5.** Diagram Alir Pembuatan Larutan HCl 6 N

- **Preparasi Larutan Basa (Wijaya, 2001 dengan Modifikasi)**

Pengenceran akan dilakukan dalam 100 mL akuades. NaOH ditimbang sebanyak 24 g menggunakan timbangan digital kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan akuades sampai tanda batas. Larutan dihomogenkan lalu disimpan kedalam botol kaca dan diamankan pada lemari penyimpanan. Diagram alir pembuatan larutan NaOH 6 N sesuai dengan Gambar 6. Perhitungan dalam pembuatan larutan NaOH 6 N dapat dilihat pada Lampiran 10.



Gambar 6. Diagram Alir Pembuatan Larutan NaOH 6 N

### 3.4.2 Prosedur Penelitian Pendahuluan

Penelitian pendahuluan dilakukan untuk mencari perbandingan sampel dan akuades (b/v) terbaik untuk pembuatan hidrolisat protein ikan sapu-sapu (*Pterygoplichthys pardalis*). Pembuatan hidrolisat protein ikan dilakukan di Laboratorium Perekayasaan Hasil Perikanan dan Laboratorium Keamanan Hasil Pangan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya. Hidrolisat protein ikan dibuat sesuai skema kerja Nurdiani *et al.* (2015) dengan modifikasi.

Sampel ikan sapu-sapu (*Pterygoplichthys pardalis*) yang telah dihaluskan diambil dari dalam *freezer* dan *dithawing*. Proses *thawing* dilakukan dengan mengalirkan air kran ke sampel yang telah dibungkus rapat oleh plastik, hal ini bertujuan agar air kran tidak masuk kedalam sampel yang akan digunakan. Sampel ditimbang sesuai kebutuhan dengan menggunakan timbangan digital ketelitian  $10^{-1}$ . Masing-masing sampel kemudian dimasukkan kedalam *beaker glass* 100 mL. Akuades ditambahkan sebagai pengencer dengan perbandingan sampel : akuades yaitu 1:0; 1:1; 1:2 dan 1:3 (b/v). Pengukuran akuades menggunakan gelas ukur 100 mL, kemudian akuades dimasukkan ke dalam *beaker glass* yang telah berisi masing-masing sampel dan dihomogenkan menggunakan spatula.

Pengukuran pH selanjutnya dilakukan dengan menggunakan pH meter untuk mencapai pH 7. Proses hidrolisis menggunakan enzim protease dengan pH

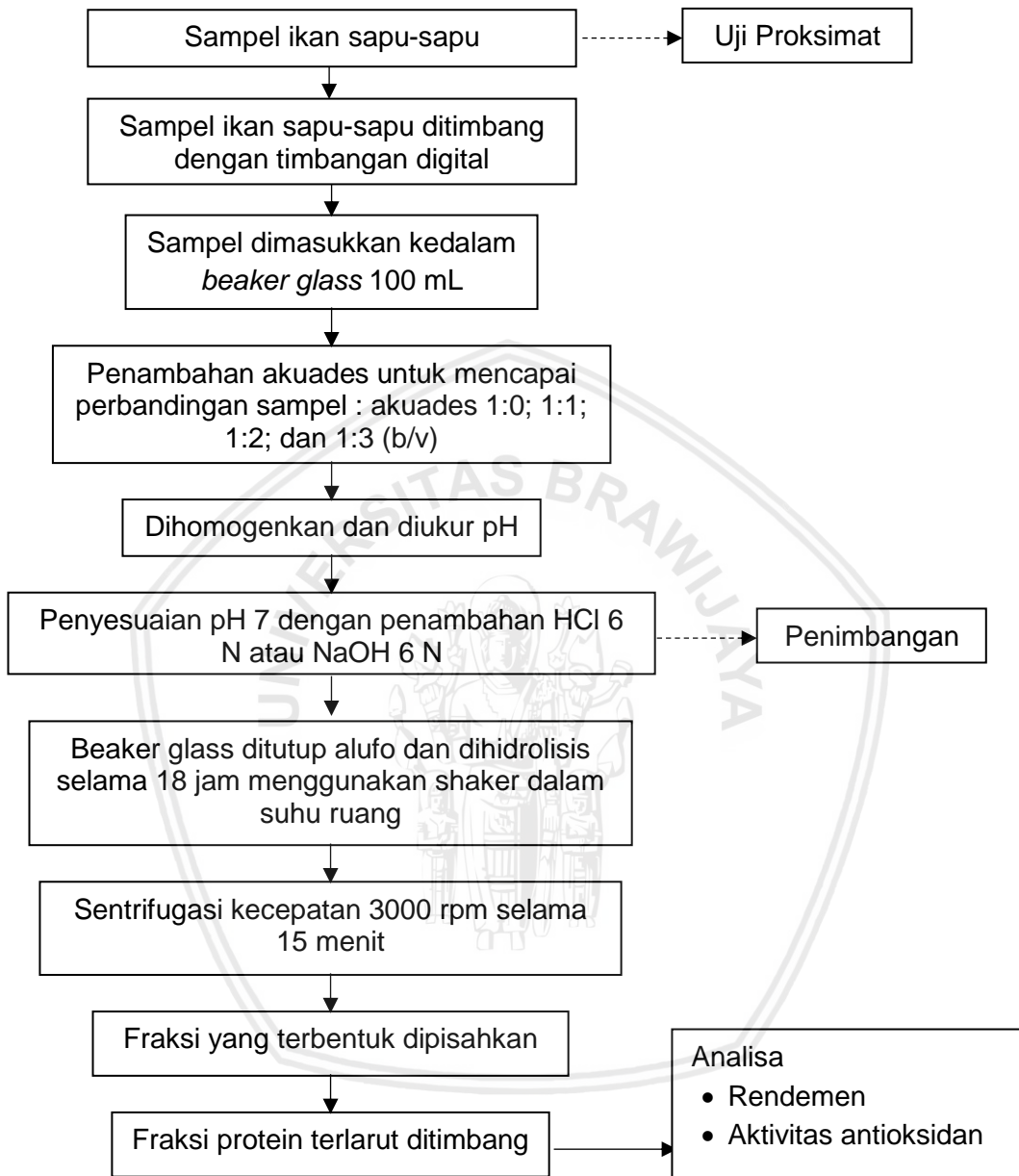
7 disamakan dengan aktivitas enzim usus. Menurut Yamin *et al.* (2008), enzim ini aktif pada kisaran pH netral. Secara umum enzim protease diproduksi oleh tubuh (pankreas) untuk mencerna protein dari pakan agar dapat diserap oleh sel-sel enterosit yang terdapat pada dinding sebelah dalam usus. Oleh protease, substrat protein didegradasi (*digest*) menjadi peptida dan selanjutnya menjadi asam amino.

Sampel yang terlalu asam perlu ditambahkan NaOH 6 N dan apabila sampel terlalu basa perlu ditambahkan HCl 6 N untuk mencapai pH 7. Penambahan asam atau basa menggunakan pipet tetes dan dicatat berapa tetes yang dibutuhkan untuk mencapai pH 7. Sampel ditimbang menggunakan timbangan digital ketelitian  $10^{-1}$ , untuk mengetahui berat sampel maka hasil penimbangan dikurangi berat *beaker glass*. *Beaker glass* kemudian ditutup *aluminium foil* agar sampel tidak terkontaminasi dan diberi label agar tidak tertukar antar perlakuan.

Proses hidrolisis dilakukan selama 18 jam sesuai dengan penelitian Nurdiani *et al.* (2016), menunjukkan bahwa pemisahan fraksi lemak dan protein terlarut optimal dengan lama inkubasi semalam atau 18 jam. Inkubasi menggunakan *shaker* agar sampel tercampur secara homogen. Proses selanjutnya yaitu pengukuran pH sampel setelah dilakukan hidrolisis. Sampel kemudian dimasukkan kedalam cuvet sentrifuge dan dilakukan proses sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit, sehingga akan terbentuk lapisan-lapisan fraksi yang berbeda. Fraksi yang terbentuk yaitu lapisan lemak, lipoprotein terang, protein terlarut, fraksi halus dan fraksi kasar. Setiap fraksi dipisahkan, dimasukkan kedalam botol salep dan ditimbang.

Perhitungan rendemen dilakukan untuk masing-masing fraksi. Fraksi protein terlarut diukur aktivitas antioksidannya menggunakan metode DPPH. Perlakuan dengan hasil rendemen protein terlarut dan aktivitas antioksidan tertinggi akan digunakan dalam penelitian utama. Diagram alir pembuatan

hidrolisat protein ikan sapu-sapu dalam penelitian pendahuluan terlihat seperti Gambar 7.

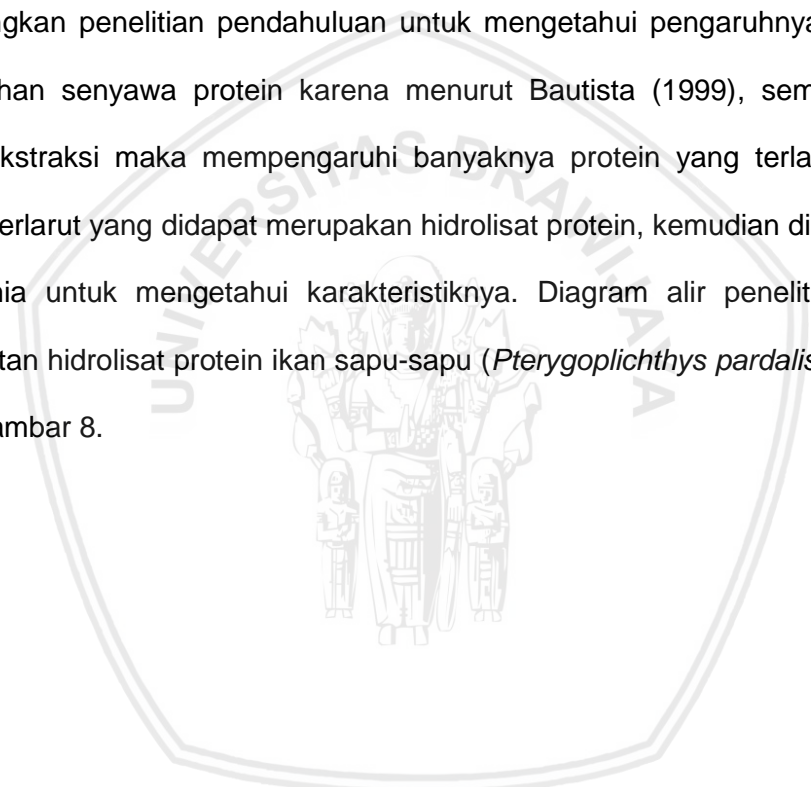


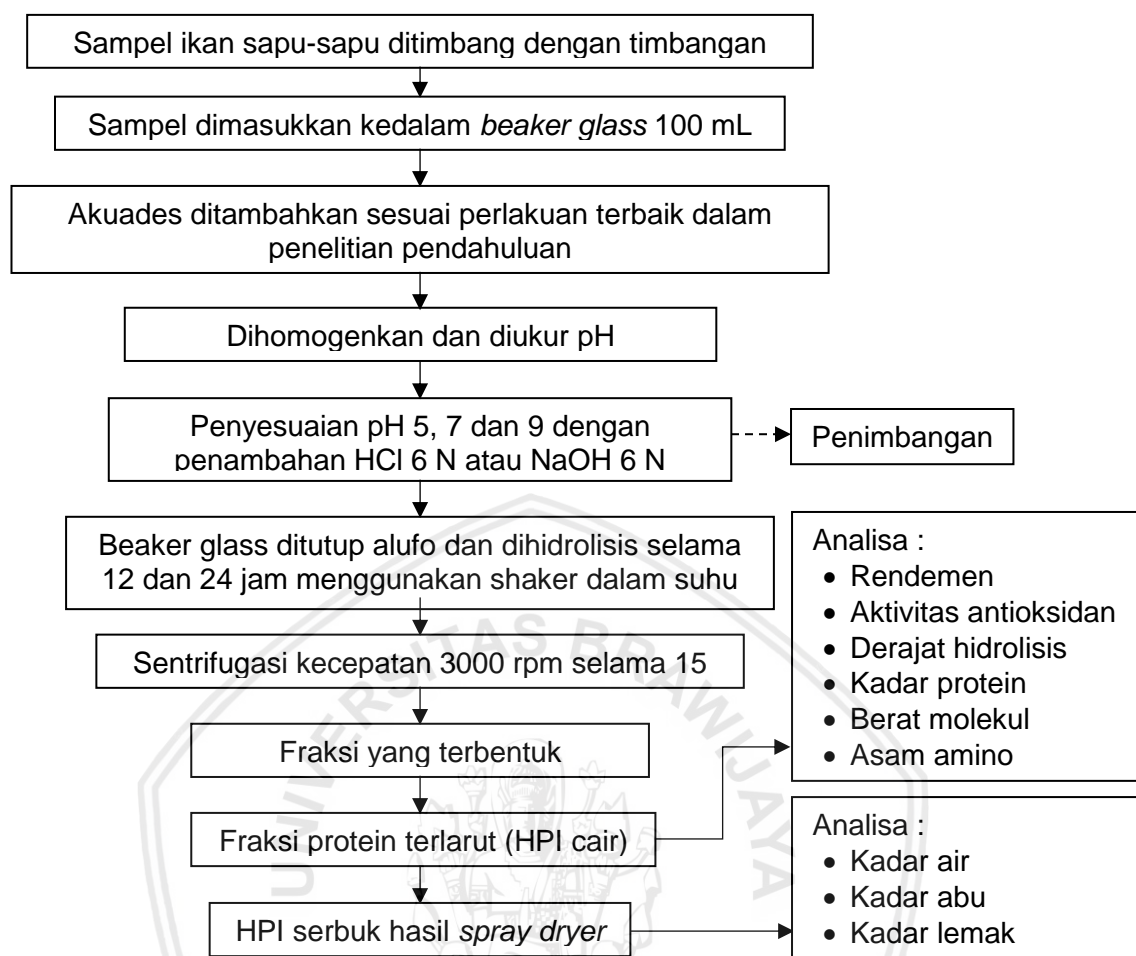
**Gambar 7.** Diagram Alir Pembuatan HPI Sapu-Sapu pada Penelitian Pendahuluan

### 3.4.3 Prosedur Penelitian Utama

Penelitian utama menggunakan perbandingan sampel dan akuades (b/v) terbaik yang diperoleh dari penelitian pendahuluan. Penelitian utama tetap menggunakan skema kerja Nurdiani *et al.* (2015) dengan modifikasi seperti yang telah dilakukan dalam penelitian pendahuluan, namun proses hidrolisis dilakukan

dengan variasi pH dan lama hidrolisis. pH yang digunakan yaitu 5, 7, dan 9 serta perlakuan kontrol yaitu tanpa mengubah pH bahan (pH 6,4). Pemilihan pH dalam perlakuan ini mengacu pada penelitian Nalinanon *et al.* (2011), bahwa kelarutan hidrolisat protein ikan kurisi dengan penambahan enzim protease dari pencernaan ikan cakalang menghasilkan peningkatan DH dari 10% menjadi 20% pada pH 5 dan 9, sementara pH 7 digunakan sesuai dengan penelitian pendahuluan. Lama hidrolisis yaitu 12 dan 24 jam, lama hidrolisis dibuat lebih cepat dan lebih lama dibandingkan penelitian pendahuluan untuk mengetahui pengaruhnya terhadap pemecahan senyawa protein karena menurut Bautista (1999), semakin lama waktu ekstraksi maka mempengaruhi banyaknya protein yang terlarut. Fraksi protein terlarut yang didapat merupakan hidrolisat protein, kemudian dilakukan uji fisikokimia untuk mengetahui karakteristiknya. Diagram alir penelitian utama pembuatan hidrolisat protein ikan sapu-sapu (*Pterygoplichthys pardalis*) disajikan pada Gambar 8.





**Gambar 8.** Diagram Alir Pembuatan HPI Sapu-Sapu pada Penelitian Utama

### 3.5 Parameter Uji

#### 3.5.1 Rendemen HPI Cair (AOAC, 2005)

Rendemen menjadi salah satu parameter perhitungan yang sangat penting dalam pembuatan hidrolisat protein ikan. Rendemen diartikan sebagai persentase berat akhir suatu proses dengan berat awal suatu proses. Menurut Anwar dan Rosmawati (2013), persentase jumlah produk hidrolisat yang diperoleh terhadap volume bahan baku awal sebelum proses hidrolisis dinyatakan sebagai rendemen hidrolisat protein.

Berat akhir yang digunakan dalam pembuatan hidrolisat protein ikan adalah berat tiap-tiap fraksi yang telah dipisahkan, sementara berat awal yaitu berat sampel yang digunakan sebelum hidrolisis. Rendemen ditentukan dengan



penimbangan berat awal dan berat akhir menggunakan timbangan digital ketelitian  $10^{-1}$ , kemudian dihitung menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat tiap fraksi}}{\text{Berat bahan baku}} \times 100\%$$

### 3.5.2 Aktivitas Antioksidan HPI Cair (Donkor *et al.*, 2012 dengan modifikasi)

Efek penghambatan radikal bebas DPPH ditentukan menurut Donkor *et al.* (2012) dengan beberapa modifikasi. Fraksi protein terlarut diambil 100  $\mu\text{L}$  menggunakan mikropipet lalu dimasukkan kedalam botol vial gelap. Sampel ditambahkan 3900  $\mu\text{L}$  larutan DPPH 0,075 mM dalam metanol. Larutan dihomogenkan dan diinkubasi selama 30 menit. Absorbansi larutan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm. Absorbansi paling rendah berarti sampel memiliki aktivitas penghambatan radikal bebas DPPH paling tinggi. Akuades ditambahkan DPPH tanpa sampel digunakan sebagai larutan blanko. Diagram alir pengujian aktivitas antioksidan dapat dilihat pada Lampiran 2. Perhitungan dalam pembuatan larutan DPPH 0,075 mM dapat dilihat pada Lampiran 10. Efek penghambatan radikal bebas dihitung berdasarkan persamaan berikut:

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

### 3.5.3 Derajat Hidrolisis HPI Cair (Hoyle and Merritt, 1994 dengan modifikasi)

Derajat hidrolisis protein terlarut pada pembuatan hidrolisat protein ikan dihitung menurut Hoyle dan Merritt (1994), dengan beberapa modifikasi. Persentase ikatan peptida yang terlepas akibat proses hidrolisis dinyatakan dengan derajat hidrolisis. Derajat hidrolisis dalam proses hidrolisis protein ikan ditentukan dengan metode soluble SN-TCA. Menurut Rutherford (2010), prinsip pengukuran derajat hidrolisis dengan metode SN-TCA adalah pengukuran kadar nitrogen yang terlarut dalam larutan trichloroacetic acid (TCA), setelah komponen

yang tidak terlarut mengalami pengendapan akibat proses sentrifuge. Keuntungan dari penggunaan metode SN-TCA adalah proses analisisnya yang relatif lebih cepat dan praktis dibandingkan metode lainnya.

Fraksi protein terlarut sebelumnya ditentukan kandungan nitrogennya dengan metode Kjeldahl (AOAC, 2005). Fraksi protein terlarut diambil sebanyak 2 mL kemudian ditambahkan TCA 20% sebanyak 2 mL dan dihomogenkan. Larutan kemudian disentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 10 menit pada suhu kamar. Supernatan diambil untuk menentukan kandungan nitrogen setelah diberi pelarut TCA 20% dengan metode Kjeldahl (AOAC, 2005). Diagram alir pengujian derajat hidrolisis dapat dilihat pada Lampiran 3. Derajat hidrolisis ditetapkan melalui persamaan sebagai berikut:

$$\% \text{ DH} = \frac{(\text{Total N dalam TCA 20\%})}{\text{Total N dalam sampel}} \times 100\%$$

#### **3.5.4 Kadar Protein HPI Cair (AOAC, 2005)**

Protein merupakan suatu molekul yang mengandung nitrogen, yang mana memiliki fungsi penting dalam tubuh manusia, salah satunya yaitu untuk penggantian sel jaringan yang rusak. Penentuan kadar protein dalam suatu bahan pangan berguna untuk mengetahui kebutuhan protein dalam tubuh. Salah satu metode yang dapat digunakan untuk menentukan kadar protein yaitu metode kjeldahl. Penentuan kadar protein dilakukan dengan metode kjeldahl. Kadar protein ditentukan dengan menimbang fraksi protein terlarut sebanyak 1 g dan dimasukkan ke dalam labu kjeldahl 30 mL. Sampel kemudian ditambah 1,67 gr tablet kjeldahl dan 15 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Sampel didestruksi selama 1-1,5 jam sampai cairan berwarna hijau jernih lalu didinginkan dan ditambah air suling perlahan-lahan. Isi labu dipindahkan ke dalam alat destilasi, ditambah 10 mL NaOH pekat sampai berwarna coklat kehitaman lalu didestilasi. Hasil destilasi ditampung dalam erlenmeyer 125 mL yang berisi 3 g boraks dalam 100 mL akuades. Larutan

ditambahkan 3 tetes methyl orange lalu dititrasi dengan HCl 0,01 N sampai terjadi perubahan warna menjadi merah muda pertama kali. Diagram pengujian kadar protein disajikan pada Lampiran 4. Perhitungan kadar protein menggunakan rumus :

$$\% N = \frac{(\text{mL HCl} - \text{mL blanko}) \times 14,007 \times N \text{ HCl}}{\text{mg sampel}} \times 100\%$$

$$\% \text{Protein} = \%N \times 6,25$$

### 3.5.5 Kadar Air HPI Serbuk (AOAC, 2005)

Kadar air merupakan kandungan air dalam suatu bahan yang dapat dinyatakan berdasarkan bobot basah dan bobot kering. Kadar air salah satu parameter penting dari suatu produk pangan, karena berkaitan dengan mutu bahan, kesegaran, penampakan, serta daya tahan bahan. Metode yang digunakan dalam menentukan kadar air adalah metode oven (metode termografimetri). Langkah pertama adalah mengkondisikan oven pada suhu yang akan digunakan hingga mencapai kondisi stabil. Cawan kosong kemudian dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 105°C selama 2 jam, setelahnya cawan kosong dipindahkan ke dalam desikator selama 15 menit sampai mencapai suhu ruang dan timbang berat cawan kosong (dihitung sebagai berat A). Sampel serbuk hidrolisat protein ikan ditimbang sebanyak 2 g dan dimasukkan ke dalam cawan lalu ditimbang (dihitung sebagai berat B). Cawan yang telah diisi dengan sampel dimasukkan ke dalam oven pada suhu 105°C selama 6 jam. Cawan berisi sampel kering dipindahkan dengan menggunakan alat penjepit ke dalam desikator selama 15 menit kemudian ditimbang (dihitung sebagai berat C). Diagram alir pengujian kadar air dapat dilihat pada Lampiran 5. Perhitungan persentase kadar air menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{(A+B) - C}{B} \times 100\%$$

Keterangan : A = berat cawan kosong (gram)

B = berat cawan+sampel awal/basah (gram)

C = berat cawan+sampel akhir/kering (gram)

### 3.5.6 Kadar Abu HPI Serbuk (AOAC, 2005)

Pengujian kadar abu dilakukan untuk menunjukkan kandungan mineral pada suatu suatu bahan. Penentuan kadar abu pada hidrolisat protein ikan dilakukan untuk mengetahui baik tidaknya proses hidrolisis dan mengetahui parameter nilai gizinya. Langkah pertama yang dilakukan adalah mengeringkan cawan didalam oven pada suhu 105<sup>o</sup>C selama 2 jam. Cawan kemudian didinginkan dengan dimasukkan kedalam desikator selama 15 menit, kemudian cawan ditimbang (A). Sampel serbuk hidrolisat protein ikan ditimbang sebanyak 1 g dan dimasukkan kedalam cawan lalu ditimbang (B). Sampel dan cawan dimasukkan ke dalam tanur dengan suhu 550<sup>o</sup>C selama 5 jam, kemudian didinginkan diluar tanur sampai suhu 120<sup>o</sup>C, dan dimasukkan dalam desikator selama 15 menit. Cawan dan abu ditimbang sehingga didapat berat konstan (C). Diagram alir pengujian kadar air dapat dilihat pada Lampiran 6. Perhitungan persentase kadar abu menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Kadar abu (\%)} = \frac{C - A}{B - A} \times 100\%$$

Keterangan : A = berat cawan kosong (gram)

B = berat cawan+sampel awal/basah (gram)

C = berat cawan+sampel akhir/kering (gram)

### 3.5.7 Kadar Lemak HPI Serbuk (AOAC, 2005)

Kadar lemak dalam suatu bahan pangan dapat diketahui dengan cara mengekstraksi lemak. Metode ekstraksi lemak terdiri dari ekstaksi lemak kering dan ekstraksi lemak basah. Ekstraksi lemak kering dapat dilakukan dengan

menggunakan metode soxhlet. Pada prinsipnya metode soxhlet ini menggunakan sampel lemak kering yang diekstraksi secara terus-menerus dalam pelarut dengan jumlah yang konstan (Darmasih 1997). Penentuan kadar lemak dengan menggunakan metode soxhlet AOAC 2005 yaitu menyiapkan kertas saring dan benang kasur dikeringkan selama 24 jam. Labu ekstraksi dibersihkan dan dikeringkan dalam oven bersuhu 105°C selama 30 menit, kemudian dimasukkan desikator 15 menit dan ditimbang beratnya. Sampel hidrolisat hasil *spray dryer* ditimbang 1 gram, dibungkus kertas saring dan ditali dengan benang kasur. Sampel dimasukkan pada alat soxhlet, labu ekstraksi dipasang dan ditambahkan pelarut petroleum eter sebanyak 30 mL. peralatan soxlet dirangkai, kondesor dan selang dipasang diatas *waterbath*. Kran air mulai dinyalakan, *waterbath* dinyalakan dan disesuaikan suhu 60°C, dan proses berjalan selama kurang lebih 6 jam. Setelah 6 jam, maka labu ekstraksi berisi sampel kemudian dioven selama 24 jam dengan suhu 105°C. Sampel dikeluarkan dari oven, dimasukkan desikator 15 menit dan ditimbang berat labu ekstraksi dengan timbangan digital. Diagram alir pengujian kadar lemak dapat dilihat pada Lampiran 7. Kadar lemak dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Kadar lemak (\%)} = \frac{(\text{Berat Labu Ekstraksi akhir}) - (\text{Berat Labu Ekstraksi awal})}{\text{Berat sampel}} \times 100\%$$

### 3.5.8 Berat Molekul HPI Cair (Dissanayake dan Vasiljevic, 2009 dengan modifikasi)

Komposisi protein dari fraksi protein terlarut akan ditentukan dengan metode SDS-PAGE berdasarkan metode Dissanayake dan Vasiljevic (2009) dengan beberapa modifikasi. Sampel yang sebanyak 15 µL dicampur dengan 15 µL *sample buffer* didalam tabung eppendorf lalu dipanaskan pada suhu 100°C selama 15 menit sampai sampel benar-benar terlarut. *Separating gel* 12% dibuat

dengan mencampurkan bahan 3,1 mL akuabides, 4,2 mL 30% acrylamide/bis 2,5 mL 1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 0,1 mL 10% SDS, 0,1 mL APS dan 4  $\mu$ L TEMED. *Plate* pembentuk gel disusun, *Separating gel* dituangkan hingga mencapai batas tertentu pada *plate*. Penuangan menggunakan mikropipet 1 mL dengan perlahan dan jangan sampai terbentuk gelembung, ditambahkan N-Butanol atau akuades diatas larutan gel agar permukaan gel rata. *Stacking gel* dibuat dengan mencampurkan bahan 1,7 mL akuabides, 0,5 mL 30% acrylamide/bis 0,7 mL 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 0,03 mL 10% SDS, 0,1 mL APS dan 3  $\mu$ L TEMED. *Stacking gel* dituangkan hingga *plate* penuh. Penuangan menggunakan mikropipet 1 mL dengan perlahan dan jangan sampai terbentuk gelembung, ditambahkan N-Butanol atau akuades diatas larutan gel agar permukaan gel rata. Sisir pembentuk sumur diletakkan secara hati-hati pada *stacking gel* sebelum gel mengeras, kemudian sisir dilepas ketika gel telah mengeras. *Plate* yang sudah berisi gel dimasukkan kedalam *chamber* elektroforesis. *Running buffer* dituang sampai bagian atas dan bawah gel terendam, tidak boleh ada gelembung didasar gel atau diantara sumur sampel. Sampel sebanyak 3  $\mu$ L dan *marker* sebanyak 1  $\mu$ L dituangkan kedalam sumur sampel secara perlahan menggunakan mikropipet 20  $\mu$ L. Perangkat elektroforesis dihubungkan dengan *power supply*, kemudian *running* dimulai pada *constant current* 20 mA 100 V hingga *tracking dye* mencapai jarak 0,5-1 cm dari dasar gel. Setelah *running* selesai, *running buffer* dituang dan gel diambil dari *plate* secara perlahan. Pewarnaan dilakukan dengan merendam gel dalam larutan *staining* yang mengandung 1 g *Commassie Brilliant Blue R-250*, 450 mL metanol, 100 mL asam asetat glasial dan 450 mL akuades. Proses dilakukan selama kurang lebih 15 menit sambil digoyang perlahan atau dapat dilakukan dengan memasukkannya kedalam mikrowave selama 5 menit. Warna dihilangkan dengan merendam gel dalam air dan dimikrowave selama 5 menit, proses ini dilakukan secara berulang-ulang hingga band protein terlihat jelas. Jarak



pita *marker* ditentukan dengan menggunakan aplikasi ImageJ, menentukan log standar marker, kemudian dibuat kurva standar untuk memperoleh nilai *slope* dan *intercept*. Jarak pita sampel ditentukan dengan menggunakan aplikasi ImageJ, log sampel ditentukan dengan mencari nilai *y*, kemudian berat molekul ( $D_a$ ) sampel diperoleh dengan rumus  $10^{(\log MW)}$ . Diagram alir pengujian berat molekul metode SDS-PAGE dapat dilihat pada Lampiran 8. Perhitungan dan komposisi larutan SDS-PAGE dapat dilihat pada Lampiran 11.

### 3.5.9 Penentuan Perlakuan Terbaik

Penentuan perlakuan terbaik menggunakan *Response Surface Method* (RSM) yang disajikan dalam *contour plot* dari hasil beberapa parameter menggunakan aplikasi Minitab 18. Metode RSM merupakan kumpulan teknik-teknik statistik dan matematika yang berguna untuk menganalisis permasalahan tentang variabel bebas yang mempengaruhi variabel terikat, serta bertujuan mengoptimalkan respon tersebut (Gaspersz, 1995). RSM adalah metode yang efektif untuk menentukan permodelan dalam optimasi proses biokimia dan bioteknologi pangan (Nurdyansyah dan Hasbullah, 2018). Menurut Ratnawati *et al.* (2017), dibandingkan dengan pendekatan satu variabel dimana titik tidak mendeteksi frekuensi interaksi antara dua atau lebih faktor, RSM merupakan metode yang dapat dipilih untuk mengetahui kondisi optimal yang dipengaruhi oleh interaksi antar variabel.

Penggunaan metode RSM untuk penentuan perlakuan terbaik mengacu pada Putra (2012), kondisi optimal dapat diketahui secara langsung apabila penelitian dilakukan secara faktorial. Langkah ini dilakukan setelah merancang formulasi secara subjektif. Kondisi respon optimal ditentukan dengan cara memplotkan variabel bebas menggunakan software minitab. Berdasarkan gambar plot permukaan (*surface plot*), karakteristik yang dimiliki titik stasioner pada

percobaan adalah titik pelana. Jika didapatkan hasil yang kurang berpengaruh (tidak bisa menunjukkan kondisi optimal) maka dapat dilakukan interpretasi dalam bentuk *contour*. Menurut Ratnawati *et al.* (2017), berdasarkan data respon yang telah diperoleh dari penentuan perlakuan secara subjektif kemudian dimasukkan kedalam kolom *worksheet* dan dianalisis data *response surface*. Data optimasi bisa dihasilkan dari hasil penentuan 3 titik *residual plot* yaitu titik *residual for plots*, *residual for fits* dan *residual versus order* yang muncul ketika respon telah dianalisis.

### 3.5.10 Asam Amino HPI Cair (SIG, 2012)

Identifikasi komposisi asam amino berdasarkan SIG (2012), menggunakan metode UPLC. Langkah pertama yang dilakukan yaitu mengambil 0,50 mL cairan sampel yang akan diuji lalu dimasukkan kedalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan 2,0 mL larutan standar internal AABA 10mM. Larutan diencerkan sampai tanda batas dengan HCl 0,1N lalu dihomogenkan dengan cara dikocok. Larutan kemudian disaring dengan menggunakan membran filter 0,22  $\mu\text{m}$ , kemudian diambil 10  $\mu\text{L}$  larutan dan dimasukkan ke dalam *insert vial*. Penambahan *AccQ-Fluor Borate* sebanyak 70  $\mu\text{L}$  lalu di-*vortex*. Penambahan *reagent fluor A* sebanyak 20  $\mu\text{L}$  kemudian di-*vortex* kembali dan diamkan selama 1 menit. Inkubasi dilakukan selama 10 menit pada suhu 55 $^{\circ}\text{C}$ . Larutan yang telah diinkubasi, kemudian disuntikkan pada sistem UPLC. Diagram aliran pengujian asam amino UPLC dapat dilihat pada Lampiran 9.

Hasil yang diperoleh dari suntikan pada sistem UPLC, dihitung untuk mendapatkan kadar asam amino dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Kadar Asam Amino } \left( \frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right) = \frac{\text{Area std/AABA std} \times \text{Vol. akhir (mL)} \times \text{fp} \times \text{C std}}{\text{Area spl/ AABA} \times \text{spl gr contoh}}$$

$$\% \text{ Kadar Asam Amino X} = \frac{\text{Kadar asam amino X } \left( \frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right)}{\text{Total kadar asam amino } \left( \frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right)} \times 100\%$$

## 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Penelitian Pendahuluan

Pada penelitian pendahuluan, dilakukan uji proksimat pada bahan baku ikan sapu-sapu (*Pterygoplichthys pardalis*) untuk mengetahui kandungan gizinya. Hasil uji proksimat bahan baku ikan sapu-sapu dapat dilihat pada Tabel 7.

**Tabel 7.** Hasil Uji Proksimat Bahan Baku Ikan Sapu-Sapu

Parameter	Sampel Ikan Sapu-Sapu	Ikan Sapu-Sapu *)
Karbohidrat (%)	0,62	-
Protein (%)	30,42	19,71
Lemak (%)	5,24	1,73
Air (%)	59,14	77,5
Abu (%)	3,36	1,01

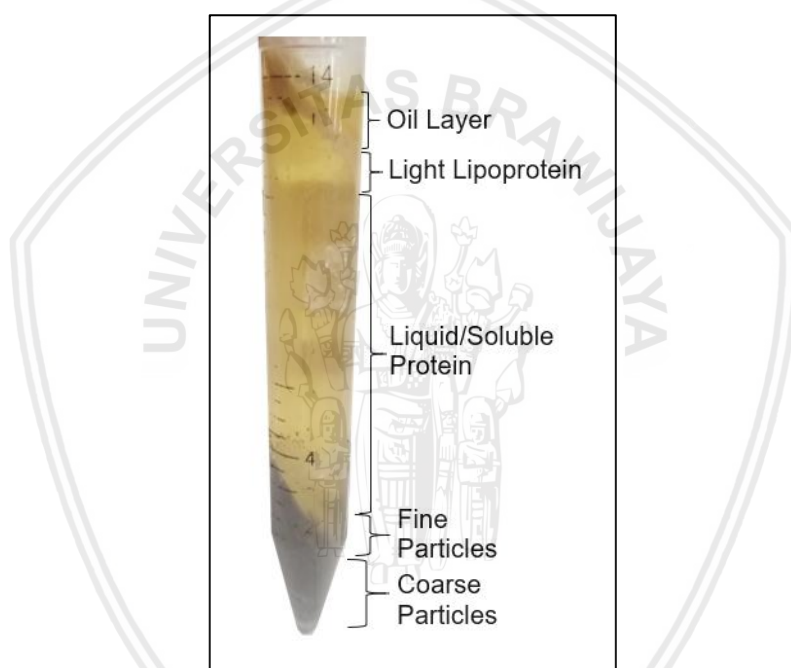
Sumber = \*) Munandar dan Eurika (2016).

Berdasarkan Tabel 7, ikan sapu-sapu dalam penelitian ini dapat digolongkan pada kelompok ikan berkadar lemak sedang (5-15%) yaitu sebesar 5,24% dan berkadar protein tinggi (>20%) yaitu sebesar 30,42%. Pada penelitian Munandar dan Eurika (2016), ikan sapu-sapu yang berasal dari Sungai Bedadung Jember dapat digolongkan pada kelompok ikan berkadar lemak rendah (<5%) yaitu sebesar 1,73% dan berkadar protein sedang (15-21%) yaitu sebesar 19,71%. Perbedaan kadar lemak dan kadar protein ikan sapu-sapu ini dapat disebabkan oleh habitat ikan yang berbeda sehingga berpengaruh pada kebiasaan makan mereka. Menurut Tunjungsari (2007), komposisi kimia daging ikan dapat berbeda-beda tergantung pada spesies ikan, tingkat umur, habitat dan kebiasaan makan ikan tersebut.

Pada penelitian pendahuluan juga dilakukan proses pembuatan hidrolisat protein ikan sapu-sapu (*Pterygoplichthys pardalis*) dengan perlakuan penambahan pengencer akuades yang berbeda yaitu perbandingan sampel : akuades = 1:0 (kontrol); 1:1; 1:2; 1:3 (b/v) dengan 3 kali pengulangan. Perlakuan terbaik didasarkan pada rendemen dan aktivitas antioksidan tertinggi.

#### 4.1.1 Rendemen HPI Cair

Hidrolisat protein ikan sapu-sapu yang telah melalui proses sentrifugasi akan membentuk 5 lapisan fraksi yang berbeda. Kelima fraksi yang terbentuk yaitu fraksi minyak (*oil layer*), fraksi lipoprotein terang (*light lipoprotein*), fraksi protein terlarut (*liquid/soluble protein*), fraksi partikel halus (*fine particles*) dan fraksi partikel kasar (*coarse particle*) di bagian cuvet paling bawah seperti terlihat pada Gambar 9. Lima fraksi utama yang berbeda dapat dibentuk dalam cuvet selama sentrifugasi tergantung pada komposisi bahan baku (Slizyte, 2004).

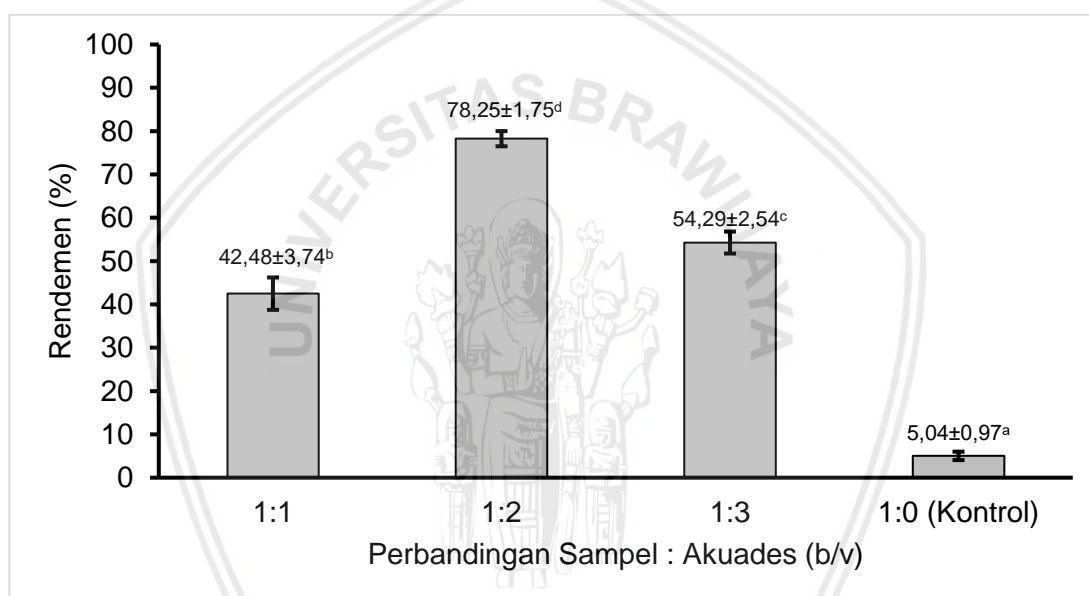


**Gambar 9.** Lapisan Fraksi Hidrolisat Protein Ikan Sapu-Sapu  
(Sumber: Dokumentasi Pribadi, 2019)

Fraksi protein terlarut merupakan hasil dari hidrolisat protein ikan. Setiap fraksi yang terbentuk dihitung rendemen untuk menentukan perbandingan penambahan pelarut akuades terbaik yang dapat menghasilkan rendemen fraksi protein terlarut paling tinggi, sehingga dapat digunakan untuk penelitian utama. Penggunaan akuades sebagai media pengencer karena akuades mampu berinteraksi dengan protein melalui reaksi elektrostatik. Menurut Jaczynski (2008), molekul air mengandung elektron negatif pada atom oksigen dan elektron positif

pada atom hidrogen, sehingga memungkinkan terjadinya reaksi elektrostatik pada permukaannya yang menimbulkan interaksi antara dipol air dan molekul bermuatan lain seperti protein.

Hasil penelitian pendahuluan menunjukkan bahwa perlakuan penambahan pelarut akuades menghasilkan rendemen dengan kisaran 42,48-78,25%, sementara tanpa penambahan pelarut sebagai sampel kontrol menghasilkan rendemen 5,04%. Hasil uji rendemen fraksi protein terlarut pada penelitian pendahuluan disajikan pada Gambar 10.



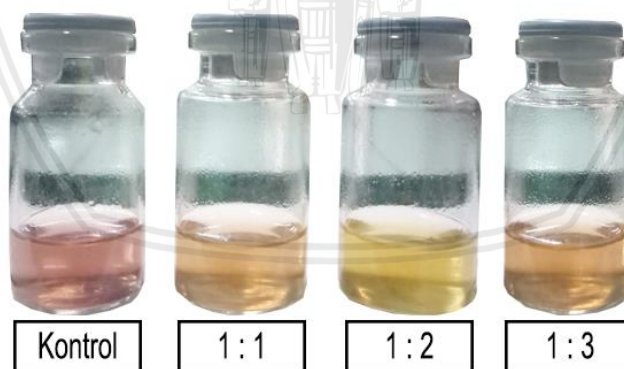
**Gambar 10.** Rendemen HPI Sapu-Sapu Penelitian Pendahuluan

Hasil analisa sidik ragam menunjukkan bahwa perlakuan perbandingan pengencer akuades memberikan hasil berbeda nyata terhadap hasil rendemen hidrolisat protein ikan ( $P < 0,05$ ). Berdasarkan Gambar 10, hasil penelitian pendahuluan menunjukkan bahwa perbandingan penambahan pelarut akuades terbaik dalam pembuatan hidrolisat protein ikan sapu-sapu adalah perbandingan 1:2 (b/v) dengan rendemen sebesar  $78,25 \pm 1,75\%$ . Hasil serupa diperoleh pada penelitian Nurdiani *et al.* (2015), tentang pembuatan hidrolisat protein limbah ikan Salmon yang dihidrolisis pada suhu ruang menghasilkan rendemen protein terlarut sebesar  $65,17 \pm 2,18\%$ . Menurut Bautista (1999), penggunaan perbandingan

pelarut yang tinggi menghasilkan ekstrak yang sangat encer sehingga lebih sulit untuk ditangani. Di sisi lain, perbandingan pelarut yang rendah menyebabkan ekstrak protein terlalu pekat, sehingga menimbulkan masalah pada viskositas dan gelasi. Namun, perbedaan bahan baku juga berpengaruh pada rendemen hidrolisat yang dihasilkan.

#### 4.1.2 Aktivitas Antioksidan HPI Cair

Antioksidan didefinisikan sebagai zat apa pun yang dapat menunda atau menghambat oksidasi suatu zat. Reaksi berantai radikal bebas dalam suatu bahan dapat dihambat dengan menambahkan bahan kimia yang menghambat pembentukan radikal bebas atau dengan memperkenalkan zat yang bersaing dengan radikal yang ada dan menghilangkannya dari media reaksi (Jun *et al.*, 2004). Potensi antioksidan dari hidrolisat protein tergantung pada komposisi asam amino dan gugus struktur tersier protein hasil pemecahan proses hidrolisis (Elias *et al.*, 2008).

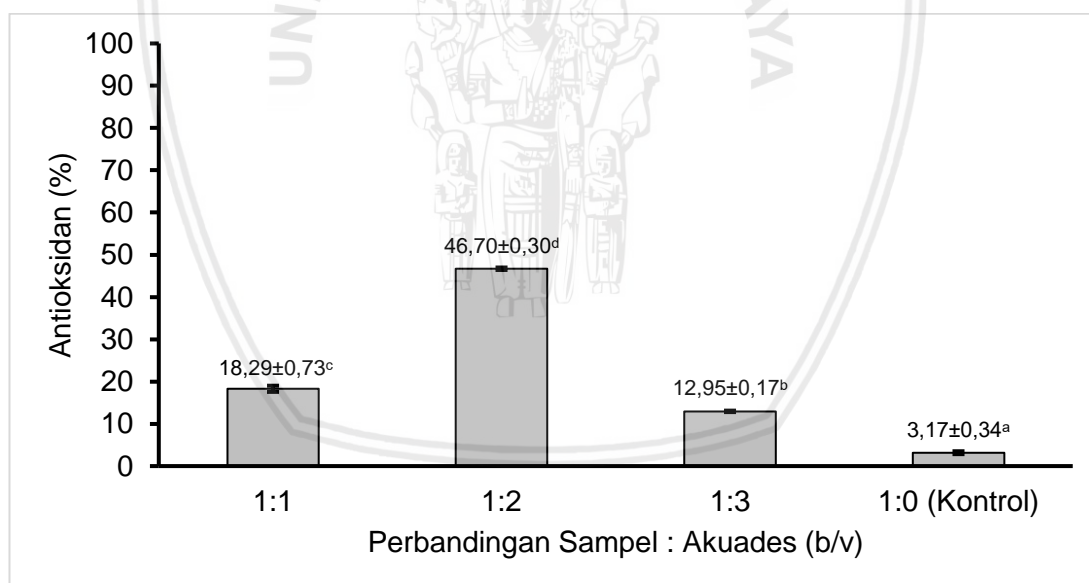


**Gambar 11.** Perubahan Warna Larutan HPI  
(Sumber: Dokumentasi Pribadi, 2019)

Secara umum semua hidrolisat yang mengandung peptida atau protein dapat mendonorkan proton dan dapat bereaksi dengan senyawa radikal untuk mengubah menjadi senyawa yang lebih stabil. Secara kualitatif, ada tidaknya aktivitas antioksidan pada sampel dapat dilihat setelah sampel ditambahkan



larutan DPPH dan diinkubasi selama 30 menit. Larutan DPPH berwarna ungu, namun ketika direaksikan dengan hidrolisat protein ikan sapu-sapu sebagai antioksidan, warna larutan berubah menjadi kuning terang seperti terlihat pada Gambar 11. Perubahan warna ini menunjukkan bahwa elektron yang tidak berpasangan pada radikal bebas DPPH telah berpasangan. Interaksi terjadi saat sampel hidrolisat protein ikan sapu-sapu mendonorkan proton pada radikal bebas DPPH, sehingga radikal tersebut menjadi netral dan tidak lagi bersifat radikal. Perubahan tersebut menunjukkan bahwa hidrolisat protein ikan sapu-sapu memiliki sifat antioksidan. Menurut Molyneux (2004), suatu senyawa dapat dikatakan memiliki aktivitas antioksidan apabila senyawa tersebut mampu mendonorkan atom hidrogennya ditandai dengan perubahan warna ungu menjadi warna kuning pucat.



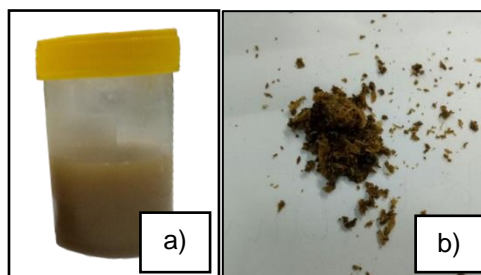
**Gambar 12.** Antioksidan HPI Sapu-Sapu Penelitian Pendahuluan

Hasil analisa sidik ragam menunjukkan bahwa perlakuan perbandingan pengencer akuades memberikan hasil berbeda nyata terhadap hasil antioksidan hidrolisat protein ikan ( $P < 0,05$ ). Berdasarkan Gambar 12, hasil penelitian pendahuluan menunjukkan bahwa perbandingan penambahan pelarut akuades terbaik dalam pembuatan hidrolisat protein ikan sapu-sapu adalah perbandingan

1:2 (b/v) dengan antioksidan sebesar  $46,70 \pm 0,30\%$ . Akuades berperan sebagai bidang kontak, dengan penambahan akuades maka enzim protease akan lebih mudah menemukan substrat dan proses katalis berjalan lebih mudah, namun apabila air yang ditambahkan dalam jumlah yang melebihi titik jenuh sedangkan rasio substratnya tetap, maka akan membuat produk menjadi lebih encer dan sulit dipisahkan dari partikel kasarnya. Pada perbandingan 1:2 kelarutan peptida lebih optimal sehingga diharapkan mampu diperoleh karakteristik produk HPI yang lebih baik. Menurut Nalinanon *et al.* (2011), ukuran peptida dan kelarutannya, komposisi asam amino, untaian dan banyaknya asam amino bebas merupakan kunci yang menentukan kapasitas penangkapan radikal bebas DPPH.

#### 4.2 Penelitian Utama

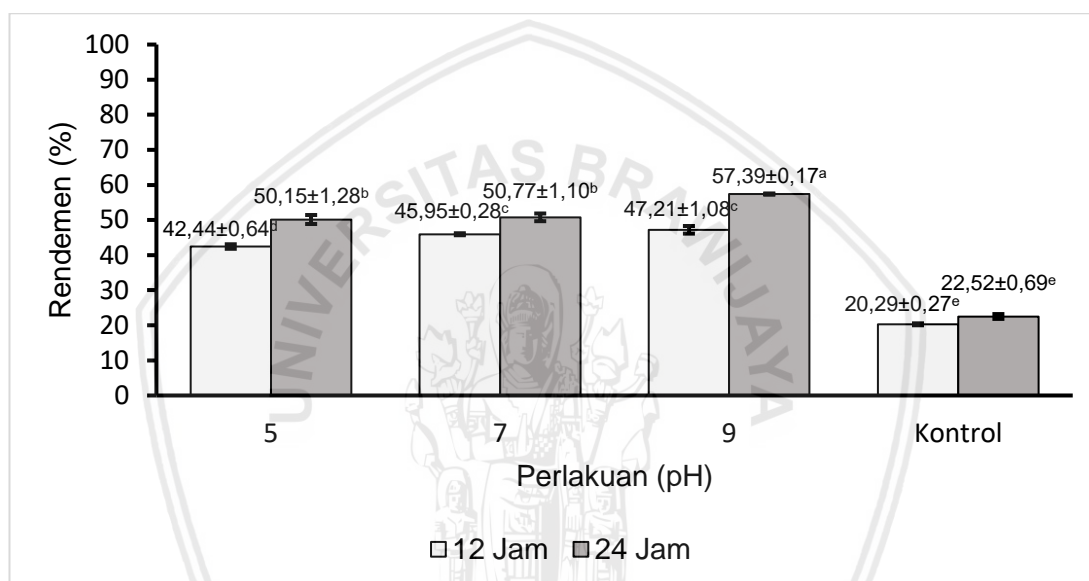
Penelitian utama dilakukan untuk mengetahui karakteristik hidrolisat protein ikan sapu-sapu yang dihasilkan dari variasi pH dan lama hidrolisis. pH yang digunakan yaitu 5, 7, 9 dan 6,4 (kontrol) dengan lama hidrolisis 12 dan 24 jam. Perbandingan sampel : akuades yang digunakan yaitu 1: 2 (b/v) sesuai dengan perlakuan terbaik pada penelitian pendahuluan. Fraksi protein terlarut merupakan hidrolisat protein yang akan diuji untuk mengetahui karakteristik hidrolisat yang diperoleh. Pengujian yang dilakukan antara lain rendemen, aktivitas antioksidan, derajat hidrolisis, kadar protein, berat molekul menggunakan sampel HPI cair, sementara pengujian kadar air, kadar abu dan kadar lemak menggunakan sampel HPI serbuk hasil *spray dryer*. HPI perlakuan terbaik akan diuji kandungan asam aminonya menggunakan sampel HPI cair. Hasil HPI sapu-sapu disajikan pada Gambar 13.



**Gambar 13.** Hasil HPI Sapu-Sapu: a) HPI Cair; b) HPI Serbuk Hasil *Spray Dryer*  
(Sumber: Dokumentasi Pribadi, 2019)

#### 4.2.1 Rendemen HPI Cair

Rendemen menjadi salah satu parameter yang penting karena dapat digunakan untuk memperkirakan banyaknya bagian bahan baku yang dapat dimanfaatkan, sehingga nilai ekonomis suatu bahan dapat diketahui (Annisa *et al.*, 2017). Nilai rendemen hidrolisat protein ikan sapu-sapu yang diperoleh merupakan persentase dari berat akhir fase cair protein terlarut dibandingkan berat sebelum inkubasi. Rendemen hidrolisat protein ikan sapu-sapu disajikan pada Gambar 14.



**Gambar 14.** Rendemen Hidrolisat Protein Ikan Sapu-Sapu

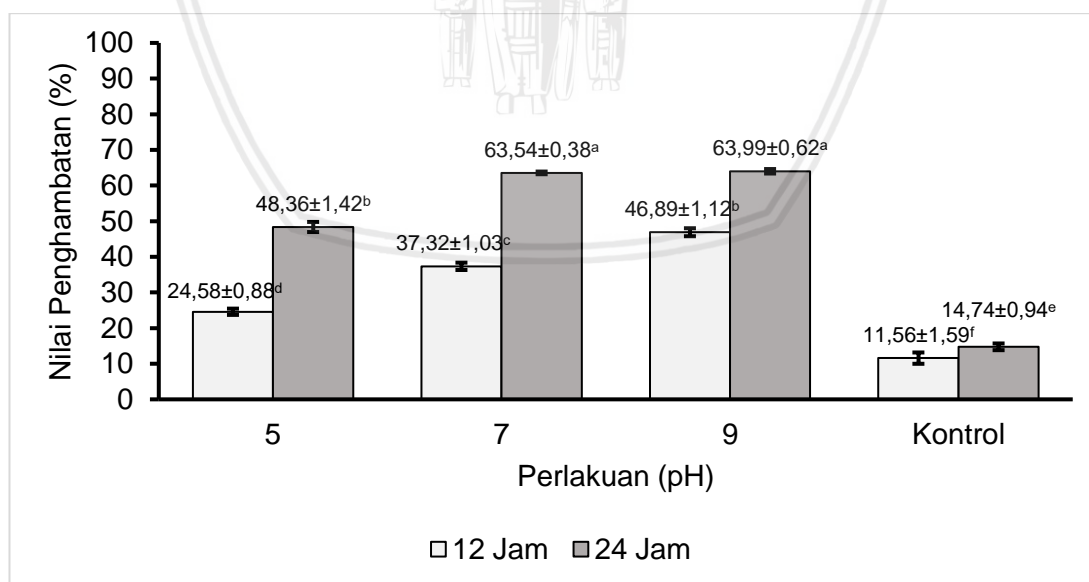
Hasil analisa sidik ragam menunjukkan bahwa perlakuan lama hidrolisis, pH dan interaksi keduanya memberikan hasil berbeda nyata ( $P < 0,05$ ). Analisa sidik ragam pengaruh lama hidrolisis dan pH terhadap rendemen hidrolisat protein ikan sapu-sapu disajikan pada Lampiran 12. Hasil penelitian menunjukkan bahwa rendemen hidrolisat protein ikan sapu-sapu berkisar antara  $20,29 \pm 0,27\%$  hingga  $57,39 \pm 0,17\%$ . Nilai rendemen hidrolisat protein ikan sapu-sapu tertinggi diperoleh pada pH 9 dengan lama hidrolisis 24 jam sebesar  $57,39 \pm 0,17\%$ , sedangkan nilai terendah diperoleh pada perlakuan kontrol dengan lama hidrolisis 12 jam sebesar  $20,29 \pm 0,27\%$ .

Pada pembuatan hidrolisat protein ikan perlu ditambahkan air untuk menstabilkan pH dan menghomogenkan bahan, sehingga berpengaruh pada laju reaksi enzimatik dan rendemen yang dihasilkan. Kondisi lain yang diduga mempengaruhi hasil rendemen adalah kondisi bahan baku ikan sapu-sapu yang telah melalui *freezing thawing*, jenis enzim yang digunakan adalah enzim endogen saluran pencernaan ikan sapu-sapu, serta kondisi hidrolisis pada suhu ruang. Menurut Jamil *et al.* (2016), perbedaan rendemen dari hidrolisat protein ikan mungkin karena perbedaan dalam spesies ikan, bagian ikan, jenis enzim yang digunakan, dan kondisi hidrolisis yang diterapkan. Menurut Purbasari (2008), terlarutnya komponen gizi seperti lemak, protein, dan mineral selama proses hidrolisis mempengaruhi besarnya rendemen produk hidrolisat yang dihasilkan.

Semakin meningkatnya pH dan lama hidrolisis maka rendemen akan semakin meningkat. pH 9 diduga merupakan pH optimal untuk kinerja enzim endogen dari saluran pencernaan ikan sapu-sapu, sementara semakin lama hidrolisis maka diduga jumlah asam amino yang dihidrolisis oleh enzim endogen akan semakin banyak. Rendemen yang dihasilkan pada penelitian ini lebih rendah dibandingkan rendemen hidrolisat protein limbah ikan salmon tanpa penambahan enzim, pH 2,5, suhu ruang dan lama hidrolisis 18 jam yaitu 65,17% (Nurdiani, 2015). Perbandingan lain menunjukkan hasil terbaik rendemen pada penelitian ini lebih tinggi jika dibandingkan dengan rendemen hidrolisat protein ikan dengan penambahan enzim, sampel ikan bandeng dengan penambahan enzim bromelin konsentrasi 6%, pH 7 dan lama inkubasi 6 jam menghasilkan rendemen 11,41% (Wijayanti *et al.*, 2015) dan hidrolisat protein tambelo penambahan enzim papain, pH 7, suhu 55°C dan lama inkubasi 1 jam menghasilkan rendemen 53,29 ± 7,36% (Anwar dan Rosmiati, 2013).

#### 4.2.2 Aktivitas Antioksidan HPI Cair

Metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) digunakan secara luas untuk percobaan kemampuan komponen dalam menangkap senyawa radikal bebas atau donor hidrogen, dan menentukan aktivitas antioksidan makanan. Metode DPPH merupakan metode yang sederhana, cepat dan murah untuk penapisan aktivitas penangkap radikal beberapa senyawa. Metode DPPH dapat digunakan untuk sampel padatan atau cairan dan tidak spesifik untuk komponen antioksidan tertentu. Oleh sebab itu, metode DPPH paling sering digunakan dibandingkan metode lainnya. Radikal bebas DPPH dapat ditunjukkan pada absorbansi maksimum 517 nm dalam etanol maupun metanol. Radikal bebas DPPH berjumpa dengan substansi pendonor proton sebagai antioksidan, radikal ditangkap dan nilai absorbansi akan berkurang (menurun). Nilai absorbansi yang didapat maka dapat dihitung nilai persen penghambatan radikal bebas DPPH, semakin besar persen penghambatan maka aktivitas antioksidan semakin tinggi. Nilai aktivitas antioksidan sampel hidrolisat protein ikan sapu-sapu disajikan pada Gambar 15.



**Gambar 15.** Nilai Aktivitas Antioksidan Hidrolisat Protein Ikan Sapu-Sapu

Analisa sidik ragam menunjukkan bahwa perlakuan lama hidrolisis, pH dan interaksi keduanya memberikan hasil berbeda nyata ( $P < 0,05$ ). Analisa sidik ragam

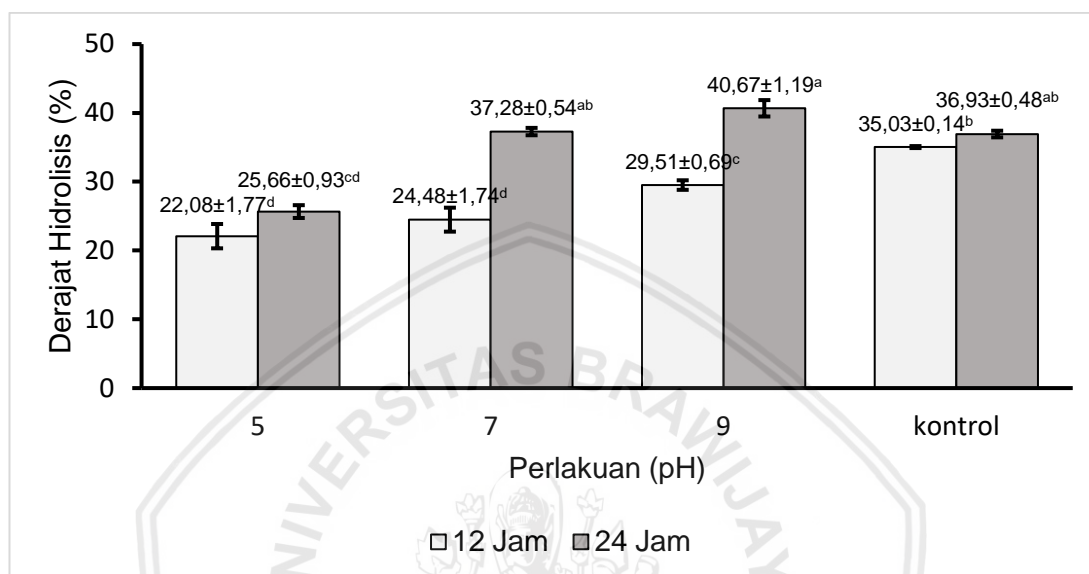
pengaruh lama hidrolisis dan pH terhadap nilai penghambatan radikal bebas hidrolisat protein ikan sapu-sapu disajikan pada Lampiran 13. Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai antioksidan sampel hidrolisat protein ikan sapu-sapu berkisar antara  $11,56 \pm 1,59\%$  hingga  $63,99 \pm 0,62\%$ . Antioksidan hidrolisat protein ikan sapu-sapu tertinggi diperoleh pada pH 9 dengan lama hidrolisis 24 jam sebesar  $63,99 \pm 0,62\%$ , sedangkan nilai terendah diperoleh pada perlakuan kontrol dengan lama hidrolisis 12 jam sebesar  $11,56 \pm 1,59\%$ . Aktivitas antioksidan dalam penelitian ini lebih tinggi jika dibandingkan dengan aktivitas antioksidan hidrolisat protein ikan patin tanpa penambahan enzim, pH 7, suhu  $55^{\circ}\text{C}$  dan lama hidrolisis 6 jam yaitu  $37,85\%$  (Baehaki *et al.*, 2015).

Perbedaan perlakuan pH dan lama hidrolisis menghasilkan persen penghambatan radikal bebas DPPH yang berbeda. Hasil ini mengindikasikan bahwa terdapatnya hubungan antara aktivitas antioksidan dengan perlakuan yang diterapkan. Peningkatan pH dan lama hidrolisis akan sejalan dengan peningkatan jumlah peptida dan asam amino bebas, sehingga nilai antioksidan yang dihasilkan juga akan meningkat. Menurut Jensen *et al.* (2009), sifat antioksidan hidrolisat protein ikan berkaitan dengan efek penghambatannya pada beberapa jalur oksidasi yang berbeda, seperti inaktivasi ROS (*Reactive Oxygen Species*), penghilangan radikal bebas, *chelating* ion logam transisi proaktif (misal  $\text{Fe}^{2+}$  dan  $\text{Cu}^{2+}$ ), dan reduksi radikal hidroperoksida. Sifat antioksidan hidrolisat protein ikan penting dalam produksi produk makanan yang stabil secara oksidatif yang diperkaya dengan protein (Slizyte, 2004). Peptida antioksidan dari protein ikan dianggap sebagai molekul yang aman dan sehat dengan berat molekul rendah, penyerapan mudah, biaya rendah, dan aktivitas tinggi (Sarmadi dan Ismail, 2010).



### 4.2.3 Derajat Hidrolisis HPI Cair

Selama proses hidrolisis terjadi pemutusan ikatan peptida pada protein oleh enzim endogen dari saluran pencernaan ikan sapu-sapu. Derajat hidrolisis sampel hidrolisat protein ikan sapu-sapu disajikan pada Gambar 16.



**Gambar 16.** Derajat Hidrolisis Hidrolisat Protein Ikan Sapu-Sapu

Analisa sidik ragam menunjukkan bahwa perlakuan lama hidrolisis, pH dan interaksi keduanya memberikan hasil berbeda nyata ( $P < 0,05$ ). Analisa sidik ragam pengaruh lama hidrolisis dan pH terhadap nilai derajat hidrolisis sampel hidrolisat protein ikan sapu-sapu disajikan pada Lampiran 14. Hasil penelitian menunjukkan bahwa derajat hidrolisis sampel hidrolisat protein ikan sapu-sapu berkisar antara  $22,08 \pm 1,77\%$  hingga  $40,67 \pm 1,19\%$ . Derajat hidrolisis tertinggi diperoleh pada pH 9 dengan lama hidrolisis 24 jam sebesar  $40,67 \pm 1,19\%$ , sedangkan nilai terendah diperoleh pada pH 5 dengan lama hidrolisis 12 jam sebesar  $22,08 \pm 1,77\%$ .

Derajat hidrolisis akan meningkat seiring dengan peningkatan pH dan lama hidrolisis, sehingga menunjukkan bahwa proses hidrolisis berlangsung semakin baik. Menurut Bautista (1999), hidrolisat limbah ikan hake memiliki kelarutan minimum protein pada kisaran pH 5-6. Perbedaan kelarutan protein ini berkaitan

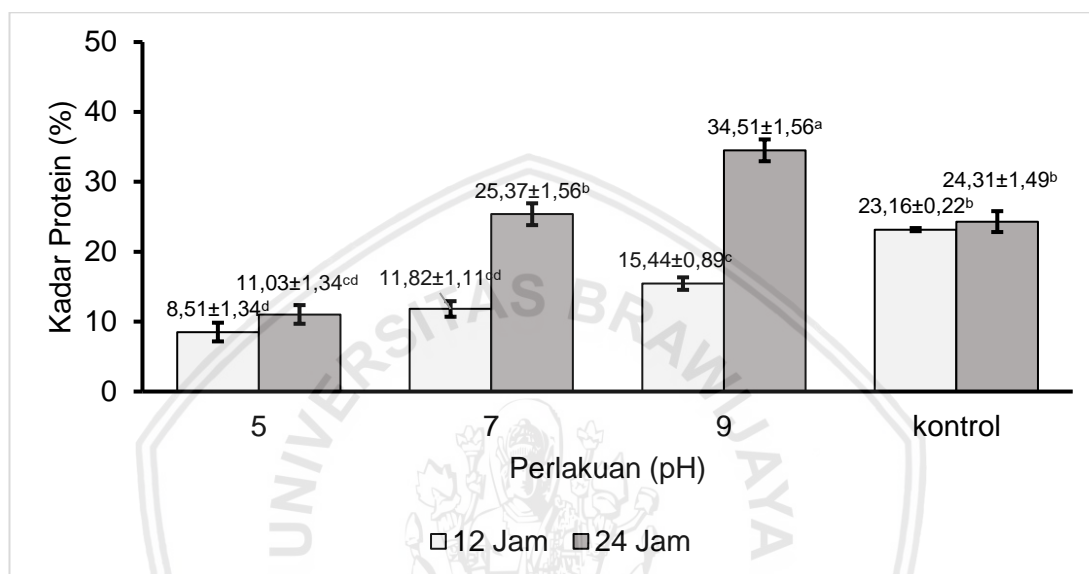
dengan spesies dan juga perlakuan terhadap bahan baku. Kelarutan protein lebih meningkat pada sisi alkali. Menurut Hasnaliza *et al.* (2010), peningkatan derajat hidrolisis disebabkan oleh peningkatan peptida dan asam amino yang terlarut dalam TCA akibat dari pemutusan ikatan peptida selama hidrolisis. Menurut Witono *et al.* (2007), semakin lama waktu hidrolisis akan menyebabkan peningkatan nilai derajat hidrolisis hingga mencapai tahap stasioner. Tahapan awal hidrolisis, enzim akan diserap oleh suspensi partikel daging, kemudian terjadi pemutusan ikatan peptida secara simultan. Pada waktu tertentu, kecepatan hidrolisis akan mengalami penurunan dan memasuki tahap stasioner. Tahap stasioner terjadi karena adanya penghambatan kinerja enzim untuk menghidrolisis substrat akibat terbentuknya produk dalam jumlah besar. Asam amino yang terbentuk dari proses hidrolisis akan menutup sisi aktif protein substrat, sehingga enzim tidak dapat melanjutkan proses hidrolisis (Witono *et al.*, 2007).

Derajat hidrolisis yang dihasilkan dalam penelitian ini lebih rendah dibandingkan derajat hidrolisis sampel hidrolisat protein limbah ikan yellowfin (*Limanda aspera*) dengan penambahan enzim saluran pencernaan ikan makarel, pH 10, suhu 50°C dan lama hidrolisis 3 jam sebesar 67% (Jun *et al.*, 2004) dan hidrolisat protein ikan patin tanpa penambahan enzim, pH 7, suhu 55°C dan lama hidrolisis 6 jam sebesar 63,21% (Baehaki *et al.*, 2015).

#### **4.2.4 Kadar Protein HPI Cair**

Protein merupakan makromolekul yang terbentuk dari asam-asam amino yang berikatan peptida. Protein berfungsi sebagai bahan bakar dalam tubuh, serta berperan sebagai zat pembangun dan pengatur. Pengukuran protein pada bahan pangan digunakan untuk mengetahui kemampuan bahan pangan sebagai sumber protein atau tidak. Protein yang dikandung oleh produk hidrolisat ini adalah protein terlarut, sedangkan protein tidak terlarut sudah terbuang pada saat sentrifuse.

Selama hidrolisis terjadi konversi protein yang bersifat tidak larut menjadi senyawa nitrogen yang bersifat larut, selanjutnya terurai menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana, seperti peptida-peptida, asam amino dan amonia sehingga mudah diserap oleh tubuh (Baehaki *et al.*, 2015). Kadar protein hidrolisat protein ikan sapu-sapu disajikan pada Gambar 17.



**Gambar 17.** Kadar Protein Hidrolisat Protein Ikan Sapu-Sapu

Analisa sidik ragam menunjukkan bahwa perlakuan lama hidrolisis, pH dan interaksi keduanya memberikan hasil berbeda nyata ( $P < 0,05$ ). Analisa sidik ragam pengaruh lama hidrolisis dan pH terhadap kadar protein hidrolisat protein ikan sapu-sapu disajikan pada Lampiran 15. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar protein hidrolisat protein ikan sapu-sapu berkisar antara  $8,51 \pm 1,34\%$  hingga  $34,51 \pm 1,56\%$ . Kadar protein hidrolisat protein ikan sapu-sapu tertinggi diperoleh pada pH 9 dengan lama hidrolisis 24 jam sebesar  $34,51 \pm 1,56\%$ , sedangkan nilai terendah diperoleh pada pH 5 dengan lama hidrolisis 12 jam sebesar  $8,51 \pm 1,34\%$ .

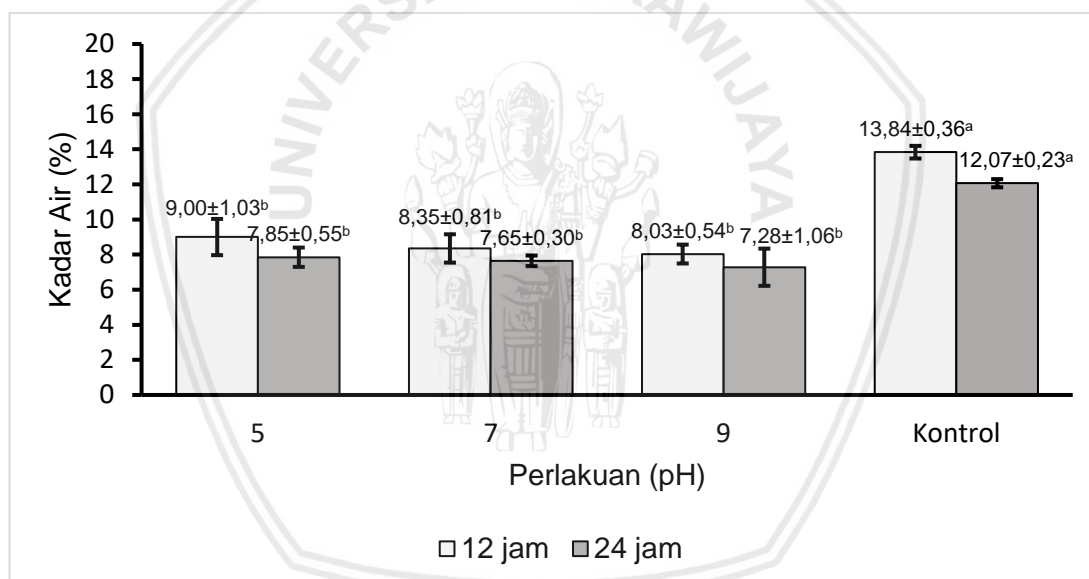
Kadar protein hidrolisat protein ikan sapu-sapu perlakuan lama hidrolisis 24 jam dan pH 9 sebesar  $34,51\%$ , hasil ini sedikit meningkat jika dibandingkan kadar protein bahan baku sebesar  $30,42\%$ . Hal ini menunjukkan bahwa proses hidrolisis

menggunakan enzim endogen optimal pada pH 9 karena terjadi perubahan protein tidak larut menjadi senyawa yang bersifat larut dan terurai menjadi asam amino. Sementara pada pH 5 dan 7 belum mampu melarutkan asam amino selama proses hidrolisis berlangsung, selain itu diduga protein terlarut pada bahan baku berkurang saat proses *thawing* dilakukan. Menurut Purbasari (2008), peningkatan kandungan protein dalam produk hidrolisat disebabkan selama proses hidrolisis terjadi konversi protein yang bersifat tidak larut menjadi senyawa nitrogen yang bersifat larut, selanjutnya terurai menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana seperti peptida dan asam amino sehingga mudah diserap oleh tubuh. Menurut Bautista (1999), lama hidrolisis juga berpengaruh terhadap kadar protein, pada hidrolisis ikan hake terjadi sedikit peningkatan sekitar 3% ketika lama hidrolisis diperpanjang dari 60 menit menjadi 120 menit.

Kadar protein yang dihasilkan pada penelitian hampir serupa dengan hidrolisat protein ikan patin tanpa penambahan enzim, pH 7, suhu 55°C dan lama hidrolisis 6 jam yaitu 20,86% (Baehaki *et al.*, 2015) dan HPI limbah Salmon tanpa penambahan enzim, pH 2,5, suhu ruang dan lama hidrolisis 18 jam yaitu 14,80%. Perbandingan lain menunjukkan hasil terbaik kadar protein pada penelitian ini lebih tinggi jika dibandingkan dengan kadar protein hidrolisat protein ikan dengan penambahan enzim, HPI nila penambahan enzim papain 5%, pH 7, suhu 55°C dan lama hidrolisis 6 jam sebesar 30,17 ± 0,44% (Annisa *et al.*, 2017) dan hidrolisat protein tambelo dengan penambahan enzim papain, pH 7, suhu 55°C dan lama inkubasi 1 jam sebesar 22,09 ± 0,19% (Anwar dan Rosmiati, 2013). Kadar protein dalam penelitian ini tidak memenuhi persyaratan mutu hidrolisat protein ikan komersil yang harus memiliki kadar protein sebesar 73,0-75,0% basis basah dan 75,26-78,95% basis kering (*International Quality Ingredients*, 2019).

#### 4.2.5 Kadar Air HPI Serbuk

Air memiliki peranan sebagai salah satu faktor yang mempengaruhi aktivitas metabolisme seperti aktivitas enzim, aktivitas mikroba, dan aktivitas kimiawi seperti terjadinya ketengikan dan reaksi-reaksi non-enzimatis sehingga dapat menimbulkan perubahan sifat organoleptik dan nilai gizinya (Setiawati, 2009). Air merupakan salah satu kandungan yang penting dari suatu bahan pangan. Air dalam bahan makanan dapat menentukan *acceptability*, kesegaran, dan daya tahan suatu bahan. Air juga dapat mempengaruhi penampakan, tekstur, cita rasa, serta mutu bahan pangan (Lombu *et al.*, 2015). Kadar air hidrolisat protein ikan sapu-sapu disajikan pada Gambar 18.



**Gambar 18.** Kadar Air Hidrolisat Protein Ikan Sapu-Sapu

Analisa sidik ragam menunjukkan bahwa perlakuan lama hidrolisis dan pH memberikan hasil berbeda nyata ( $P < 0,05$ ), sementara interaksi keduanya memberikan hasil tidak berbeda nyata ( $P > 0,05$ ). Analisa sidik ragam pengaruh lama hidrolisis dan pH terhadap kadar air hidrolisat protein ikan sapu-sapu disajikan pada Lampiran 16. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar air hidrolisat protein ikan sapu-sapu berkisar antara  $7,28 \pm 1,06\%$  hingga  $13,84 \pm 0,36\%$ . Kadar air hidrolisat protein ikan sapu-sapu tertinggi diperoleh pada pH 5

dengan lama hidrolisis 12 jam sebesar  $9,00 \pm 1,03\%$ , sedangkan nilai terendah diperoleh pada pH 9 dengan lama hidrolisis 24 jam sebesar  $7,28 \pm 1,06\%$ .

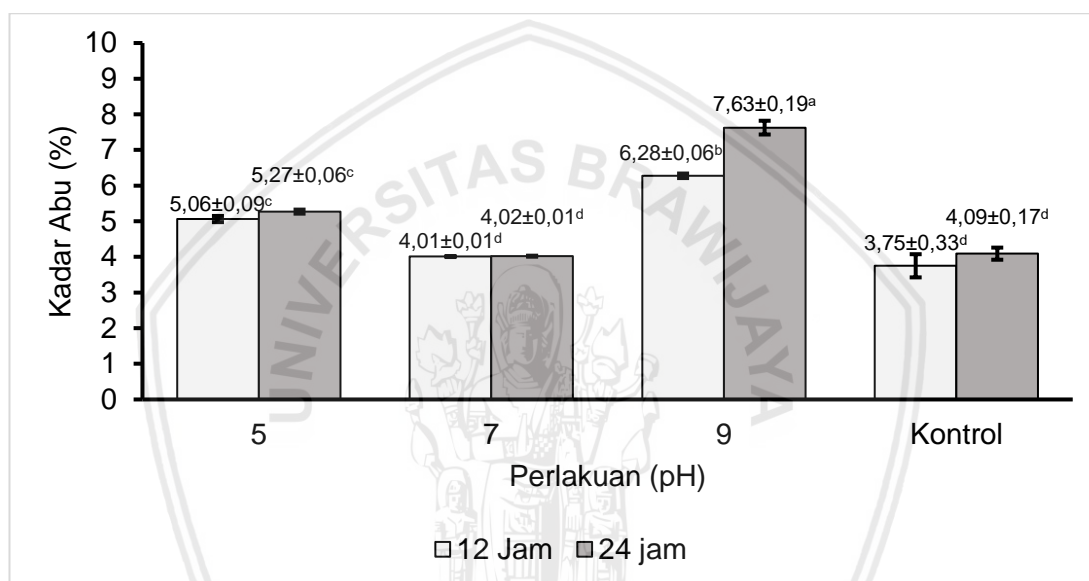
Kadar air hasil penelitian mengalami penurunan dibandingkan kadar air bahan baku ikan sapu-sapu sebesar 59,14%, hal ini disebabkan karena penggunaan metode *spray dryer* dengan temperatur tinggi untuk pembuatan serbuk HPI sapu-sapu terbukti mampu menghilangkan sebagian besar kandungan air. Menurut Riansyah *et al.* (2013), kemampuan bahan untuk melepaskan air dari permukaannya akan semakin besar dengan meningkatnya suhu udara pengering yang digunakan dan makin lamanya proses pengeringan sehingga kadar air yang dihasilkan semakin rendah. Hasil serupa diperoleh pada sampel ikan capelin (*Mallotus visollus*) menurut Shahidi *et al.* (1995), sampel padat HPI hasil proses *dehidration* dibuat tanpa penambahan enzim, pH 3 dan suhu  $25^{\circ}\text{C}$  memiliki kadar air sebesar 5,78%, hasil ini mengalami penurunan jika dibandingkan kadar air bahan baku ikan capelin sebesar 79,1%.

Kadar air yang dihasilkan dalam penelitian ini lebih rendah dibandingkan kadar air hidrolisat protein ikan nila basis kering hasil *spray dryer* dengan suhu *inlet*  $160^{\circ}\text{C}$ , hidrolisat ini dibuat dengan penambahan enzim papain 0%, pH 7, suhu  $55^{\circ}\text{C}$  dan lama hidrolisis 6 jam sebesar  $9,06 \pm 0,09$  (Annisa *et al.*, 2017) dan hidrolisat protein tambelo basis kering dengan penambahan enzim papain, pH 7, suhu  $55^{\circ}\text{C}$  dan lama inkubasi 3 jam dengan hasil kadar air  $10,16 \pm 0,17\%$  (Anwar dan Rosmiati, 2013). Kadar air dalam penelitian ini tidak memenuhi persyaratan mutu hidrolisat protein ikan komersil yang harus memiliki kadar air sebesar 3,0-5,0% basis basah dan dibawahnya untuk basis kering (*International Quality Ingredients*, 2019).



#### 4.2.6 Kadar Abu HPI Serbuk

Sebagian besar bahan pangan terdiri atas 96% bahan organik dan airnya terdiri atas unsur-unsur mineral. Proses pembakaran bahan pangan sampai suhu 600°C akan menyebabkan bahan organik terbakar, namun bahan anorganik tidak terbakar, yaitu dalam bentuk abu yang terdiri atas berbagai unsur mineral seperti Ca, Mg, Na, P, K, Fe, Mn dan Cu (Wijayanti *et al.*, 2015). Kadar abu hidrolisat protein ikan sapu-sapu disajikan pada Gambar 19.



**Gambar 19.** Kadar Abu Hidrolisat Protein Ikan Sapu-Sapu

Analisa sidik ragam menunjukkan bahwa perlakuan lama hidrolisis, pH dan interaksi keduanya memberikan hasil berbeda nyata ( $P < 0,05$ ). Analisa sidik ragam pengaruh lama hidrolisis dan pH terhadap kadar abu hidrolisat protein ikan sapu-sapu disajikan pada Lampiran 17. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar abu hidrolisat protein ikan sapu-sapu berkisar antara  $3,75 \pm 0,33\%$  hingga  $7,63 \pm 0,19\%$ . Kadar abu hidrolisat protein ikan sapu-sapu tertinggi diperoleh pada pH 9 dengan lama hidrolisis 24 jam sebesar  $7,63 \pm 0,19\%$ , sedangkan nilai terendah diperoleh pada pH 7 dengan lama hidrolisis 12 jam sebesar  $4,01 \pm 0,01\%$ .

Bahan baku ikan sapu-sapu memiliki kadar abu sebesar 3,36%, pada pembuatan hidrolisat perlakuan pH 5 dan 9 kadar abu meningkat secara signifikan,

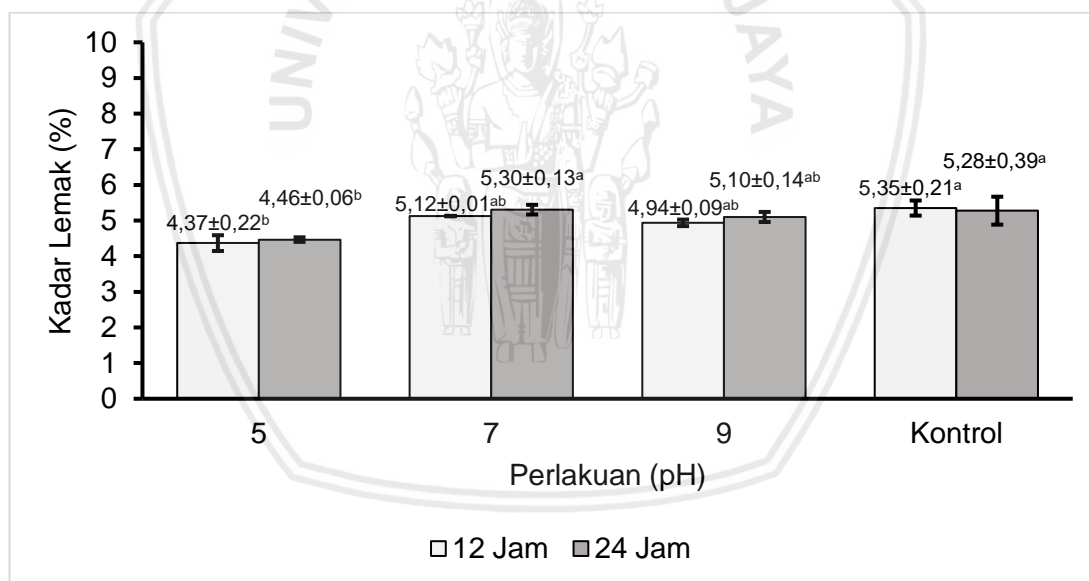
hal ini disebabkan karena adanya penambahan HCl 6N dan NaOH 6N untuk penyesuaian pH. Bahan baku memiliki pH awal sekitar 6,4, sehingga untuk mencapai pH 9 dibutuhkan NaOH 6N sekitar 26 tetes ( $\pm 1,3$  mL), sementara untuk mencapai pH 5 dibutuhkan HCl sekitar 7 tetes ( $\pm 0,35$  mL). Hal tersebut menjadi alasan pada pH 9 kadar abunya lebih tinggi. Menurut Wijayanti *et al.* (2015), penambahan senyawa alkali, seperti NaOH, dan atau senyawa asam, seperti HCl, dalam proses hidrolisis protein bertujuan untuk mencapai nilai pH optimum enzim dan menjaga agar pH tetap konstan selama proses hidrolisis sehingga pemutusan ikatan peptida oleh enzim dapat tetap berlangsung. Pencampuran senyawa asam dan alkali dalam larutan hidrolisat protein akan menyebabkan terbentuknya senyawa garam, sehingga dapat meningkatkan kadar abu pada hidrolisat protein. Hasil serupa diperoleh pada sampel ikan capelin (*Mallotus visollus*) menurut Shahidi *et al.* (1995), sampel padat HPI hasil proses *dehidration* dibuat tanpa penambahan enzim, pH 3 dan suhu 25°C memiliki kadar abu sebesar 17,70%, hasil ini mengalami peningkatan jika dibandingkan kadar abu bahan baku ikan capelin sebesar 2,41%.

Kadar abu yang dihasilkan pada penelitian ini lebih tinggi dibandingkan kadar abu hidrolisat protein limbah ikan salmon tanpa penambahan enzim, pH 2,5, suhu ruang dan lama hidrolisis 18 jam yaitu 2,40% (Nurdiani, 2015). Perbandingan lain menunjukkan hasil terbaik kadar abu pada penelitian ini lebih rendah jika dibandingkan dengan kadar abu hidrolisat protein ikan dengan penambahan enzim, HPI bandeng dengan penambahan enzim bromelin konsentrasi 6%, pH 7 dan lama inkubasi 6 jam memiliki kadar abu sebesar  $10,61 \pm 1,40\%$  (Wijayanti *et al.*, 2015) dan hidrolisat protein tambelo basis kering dengan penambahan enzim papain, pH 7, suhu 55°C dan lama inkubasi 1 jam memiliki kadar abu sebesar  $11,78 \pm 0,49\%$  (Anwar dan Rosmiati, 2013). Kadar abu dalam penelitian ini tidak memenuhi persyaratan mutu hidrolisat protein ikan komersil yang harus memiliki

kadar abu sebesar 4,0-7,0% basis basah dan 4,12-7,37% basis kering (*International Quality Ingredients*, 2019), kecuali perlakuan lama inkubasi 24 jam dan pH 9.

#### 4.2.7 Kadar Lemak HPI Serbuk

Kadar lemak dalam suatu bahan pangan mempengaruhi perubahan mutu produk selama penyimpanan. Kerusakan lemak diakibatkan oleh proses oksidasi sehingga timbul bau busuk dan rasa tengik, yang disebut proses ketengikan. Analisis kadar lemak bertujuan untuk mengetahui kemungkinan daya simpan, karena mempengaruhi mutu suatu produk pangan. Lemak berhubungan dengan mutu bahan pangan dimana kerusakan lemak menurunkan nilai gizi (Winarno, 1997). Kadar lemak hidrolisat protein ikan sapu-sapu disajikan pada Gambar 20.



**Gambar 20.** Kadar Lemak Hidrolisat Protein Ikan Sapu-Sapu

Analisa sidik ragam menunjukkan bahwa perlakuan pH memberikan hasil berbeda nyata ( $P < 0,05$ ), sementara perlakuan lama hidrolisis dan interaksi keduanya memberikan hasil tidak berbeda nyata ( $P > 0,05$ ). Analisa sidik ragam pengaruh lama hidrolisis dan pH terhadap kadar lemak hidrolisat protein ikan sapu-sapu disajikan pada Lampiran 18. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar lemak hidrolisat protein ikan sapu-sapu berkisar antara  $4,37 \pm 0,22\%$  hingga  $5,30$

$\pm 0,13\%$ . Kadar lemak hidrolisat protein ikan sapu-sapu tertinggi diperoleh pada pH 7 dengan lama hidrolisis 24 jam sebesar  $5,30 \pm 0,13\%$ , sedangkan nilai terendah diperoleh pada pH 5 dengan lama hidrolisis 12 jam sebesar  $4,37 \pm 0,22\%$ .

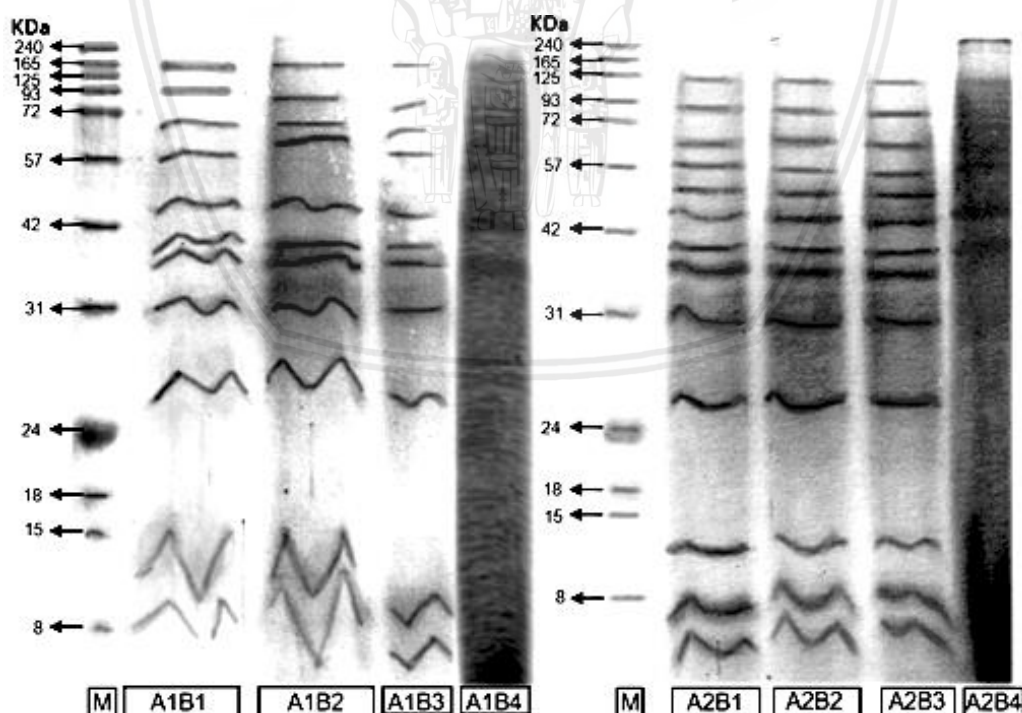
Kadar lemak hasil penelitian mengalami penurunan dibandingkan kadar lemak bahan baku ikan sapu-sapu sebesar  $5,24\%$ , hal ini disebabkan karena adanya pemisahan lemak dengan protein tidak larut selama proses sentrifugasi. Menurut Shahidi *et al.* (1995), pada saat proses hidrolisis enzimatis terjadi perubahan struktur jaringan ikan yang sangat cepat sehingga menyebabkan kadar lemak menurun. Hasil pengamatan dengan mikroskop elektron terhadap bagian tipis dari otot ikan menunjukkan protein miofibril banyak berkurang selama proses hidrolisis, sedangkan sistem membran sel otot terlihat relatif resisten dari kerusakan. Pada saat proses hidrolisis, membran ini cenderung berkumpul dan membentuk gelembung yang tak larut, mengakibatkan hilangnya membran lipid yang berdampak pada penurunan kadar lemak. Hasil serupa diperoleh pada sampel ikan capelin (*Mallotus visollus*) menurut Shahidi *et al.* (1995), sampel padat HPI hasil proses *dehydration* dibuat tanpa penambahan enzim, pH 3 dan suhu  $25^{\circ}\text{C}$  memiliki kadar lemak sebesar  $1,51\%$ , hasil ini mengalami penurunan jika dibandingkan kadar lemak bahan baku ikan capelin sebesar  $3,56\%$ .

Kadar lemak yang dihasilkan pada penelitian ini lebih rendah dibandingkan kadar lemak hidrolisat protein limbah ikan salmon tanpa penambahan enzim, pH 2,5, suhu ruang dan lama hidrolisis 18 jam yaitu  $18,90\%$  (Nurdiani, 2015). Perbandingan lain menunjukkan hasil terbaik kadar lemak pada penelitian ini lebih tinggi jika dibandingkan dengan kadar lemak hidrolisat protein ikan dengan penambahan enzim, HPI bandeng basis kering dengan penambahan enzim bromelin konsentrasi  $6\%$ , pH 7 dan lama inkubasi 6 jam memiliki kadar lemak sebesar  $0,48 \pm 0,14\%$  (Wijayanti *et al.*, 2015) dan HPI nila basis kering hasil *spray*

dryer dengan suhu *inlet* 160°C yang dibuat dengan penambahan enzim papain 5%, pH 7, suhu 55°C dan lama hidrolisis 6 jam memiliki kadar lemak sebesar 0,07 ± 0,01% (Annisa *et al.*, 2017). Kadar lemak dalam penelitian ini memenuhi persyaratan mutu hidrolisat protein ikan komersil yang harus memiliki kadar lemak sebesar 19,0-22,0% basis basah dan 19,59-23,16% basis kering (*International Quality Ingredients*, 2019).

#### 4.2.8 Berat Molekul HPI Cair

Metode yang paling umum digunakan untuk memisahkan protein adalah dengan cara elektroforesis menggunakan *discontinuous polyacrylamide gel* sebagai medium penyangga dan *sodium dodecyl sulfate* (SDS) untuk mendenaturasi protein. Metode ini disebut *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS PAGE) (Baehaki *et al.*, 2015). Pita protein HPI sapu-sapu hasil SDS-PAGE dapat dilihat pada Gambar 21.



Gambar 21. Pita Protein HPI Sapu-Sapu Hasil SDS-PAGE



**Tabel 8.** Jumlah Pita (*Band*) Hidrolisat Protein Ikan Sapu-Sapu

No.	Sampel	Berat Molekul (BM)
1	A1B1	123,03 KDa; 109,55 KDa; 92,94 KDa; 80,00 KDa; 63,12 KDa; 53,55 KDa; 49,57 KDa; 39,68 KDa; 26,82 KDa; 13,03 KDa; dan 9,44 KDa
2	A1B2	122,23 KDa; 104,88 KDa; 87,28 KDa; 72,98 KDa; 65,61 KDa; 51,03 KDa; 48,38 KDa; 43,29 KDa; 29,40 KDa; 12,37 KDa; dan 10,65 KDa
3	A1B3	122,43 KDa; 100,42 KDa; 90,72 KDa; 80,78 KDa; 60,44 KDa; 51,52 KDa; 47,46 KDa; 37,81 KDa; 24,95 KDa; 8,74 KDa; dan 7,23 KDa
4	A2B1	117,53 KDa; 101,23 KDa; 84,82 KDa; 77,21 KDa; 66,51 KDa; 58,25 KDa; 49,62 KDa; 44,43 KDa; 34,65 KDa; 22,15 KDa; 10,50 KDa; 7,66 KDa dan 6,14 KDa
5	A2B2	118,17 KDa; 100,67 KDa; 87,20 KDa; 74,70 KDa; 66,15 KDa; 57,61 KDa; 49,35 KDa; 44,19 KDa; 33,15 KDa; 21,90 KDa; 10,62 KDa; 8,01 KDa dan 6,53 KDa
6	A2B3	116,87 KDa; 100,12 KDa; 84,35 KDa; 72,66 KDa; 65,42 KDa; 56,98 KDa; 48,54 KDa; 44,19 KDa; 33,52 KDa; 22,77 KDa; 10,86 KDa; 8,33 KDa; dan 7,02 KDa

Keterangan :

M = Marker (*Protein Standart*)

A1B1 = Perlakuan 12 Jam pH 5

A1B2 = Perlakuan 12 Jam pH 7

A1B3 = Perlakuan 12 Jam pH 9

A1B4 = Kontrol (pH 6,4) 12 Jam

A2B1 = Perlakuan 24 Jam pH 5

A2B2 = Perlakuan 24 Jam pH 7

A2B3 = Perlakuan 24 Jam pH 9

A2B4 = Kontrol (pH 6,4) 24 Jam

Jumlah pita (*band*) hidrolisat protein ikan sapu-sapu dapat dilihat pada Tabel 8. Pada perlakuan lama hidrolisis 12 jam terbentuk pita protein sebanyak 11 dengan kisaran berat molekul 7,23 -123,03 KDa. Pada perlakuan lama hidrolisis 24 jam terbentuk pita protein sebanyak 13 dengan kisaran berat molekul 6,14 - 118,17 KDa. Hasil penelitian ini memperlihatkan bahwa perlakuan 24 jam lebih efektif dalam memutus ikatan peptida protein menjadi peptida dan asam amino dengan berat molekul rendah. Menurut Damodaran (1996), hidrolisis protein enzimatis menggunakan enzim protease umumnya menghasilkan peptida dengan bobot molekul rendah. HPI sapu-sapu hasil penelitian memiliki berat molekul yang lebih tinggi dibandingkan HPI patin menurut Baehaki *et al.* (2015), HPI patin dibuat tanpa penambahan enzim pH 7, suhu 55°C dan lama hidrolisis 6 jam didapat jumlah pita sebanyak 7 dengan berat molekul masing-masing 65,20 kDa; 42,62



kDa; 31,46 kDa; 27,86 kDa, 27,85 kDa, 19,35 kDa dan 11,90 kDa. Kurva standar *marker* protein SDS-PAGE disajikan pada Lampiran 19.

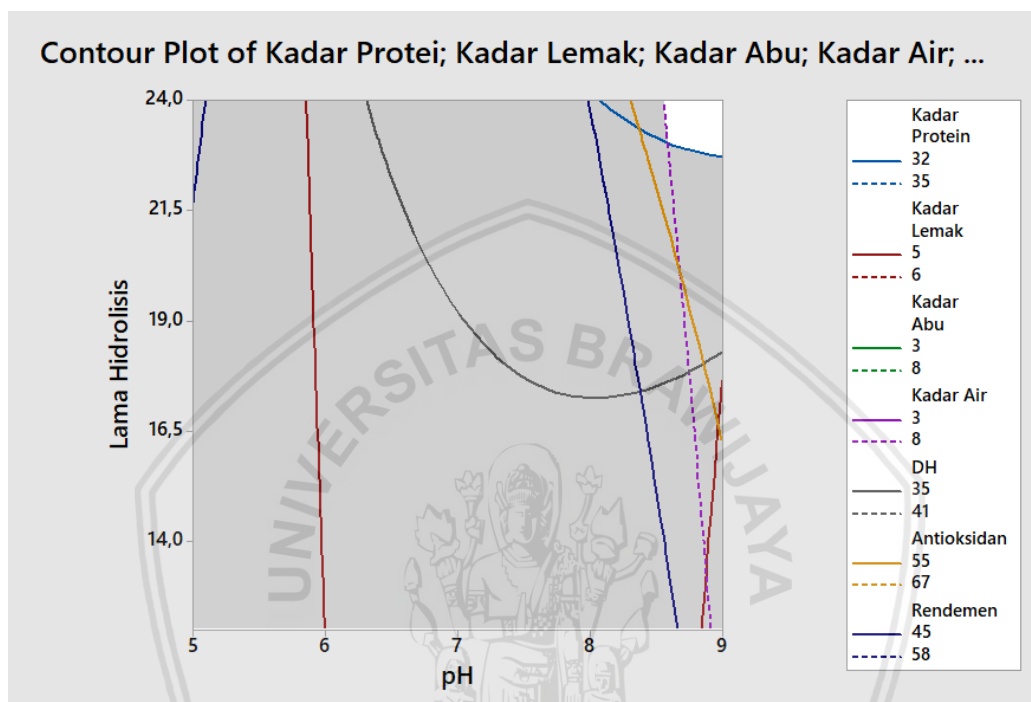
Pada perlakuan kontrol (pH 6,4) dengan lama hidrolisis 12 dan 24 jam, jumlah pita yang didapat lebih banyak dengan berat molekul lebih tinggi karena tidak adanya penyesuaian pH, sehingga protein tidak terpecah menjadi fraksi yang lebih kecil karena enzim endogen berada pada pH yang kurang optimal. Menurut Belkaaloul *et al.* (2010), selama proses hidrolisis protein oleh enzim proteolitik berlangsung terjadi memecah protein menjadi fraksi-fraksi protein yang lebih kecil, apabila didapatkan jumlah pita (*band*) protein yang lebih banyak dan lebih tinggi maka dimungkinkan karena tidak adanya pemutusan ikatan peptida.

Menurut Annisa *et al.* (2007), hidrolisis akan mengurangi berat molekul protein dan memperbanyak jumlah dari gugusan polar. Semakin rendah berat molekulnya, maka pemecahan protein menjadi senyawa yang lebih sederhana berjalan semakin baik. Hal ini juga berpengaruh pada sifat fungsional hidrolisat yang semakin meningkat. Ukuran molekul yang semakin kecil akan berperan penting pada pengikatan kalsium. Menurut Hoa *et al.* (2008), peptida dengan panjang asam amino sekitar 7-30 umumnya mempunyai kemampuan pengikatan kalsium paling optimal. Aktivitas pengikatan kalsium berfungsi untuk memaksimalkan penyerapan kalsium dalam tubuh.

#### 4.2.9 Penentuan Perlakuan Terbaik

Metode *Response Surface Methodology* (RSM) digunakan untuk mengetahui kondisi optimum perlakuan yang masih diterima oleh respon, sehingga dapat digunakan untuk menentukan perlakuan terbaik. Faktor dalam penelitian ini ada 2 yaitu pH dan lama hidrolisis, faktor ini akan berpengaruh pada respon dari tiap karakteristik HPI sapu-sapu yang berupa rendemen, antioksidan, DH, kadar air, kadar abu, kadar lemak dan kadar protein. Perlakuan yang masih

dapat diterima dapat dilihat dari terbentuknya area putih pada *contour plot*. Grafik *contour plot* HPI sapu-sapu berdasarkan interaksinya dengan karakteristik yang diuji disajikan pada Gambar 22. Grafik nilai optimasi HPI sapu-sapu dapat dilihat pada Lampiran 20.



**Gambar 22.** Grafik *Contour Plot* HPI Sapu-Sapu

Berdasarkan Gambar 22, diketahui bahwa perlakuan yang diterima oleh respon berkisar pada pH 8,8-9 dan lama hidrolisis 22,8-24 jam. Hasil ini dapat digunakan sebagai prediksi bahwa perlakuan terbaik pembuatan HPI sapu-sapu adalah pH 9 dengan lama hidrolisis 24 jam. perlakuan terbaik menunjukkan bahwa pH basa merupakan pH optimum untuk kinerja enzim protease endogen sedangkan semakin lama waktu hidrolisis maka pemecahan protein menjadi asam amino semakin baik. Hidrolisis tergantung pada kondisi optimal jenis protease endogen, contohnya adalah enzim endogen saluran pencernaan ikan kakap dan tongkol optimal pada pH 9 dengan suhu 45°C dan 55°C (Singh dan Benjakul, 2018). Hasil perlakuan terbaik HPI sapu-sapu disajikan pada Tabel 9.

**Tabel 9.** Hasil Perlakuan Terbaik HPI Sapu-Sapu

No.	Parameter	pH 9 Lama Hidrolisis 24 Jam
1	Rendemen	57,39 %
2	Antioksidan	63,99 %
3	Derajat Hidrolisis (DH)	40,67 %
4	Kadar Air	7,28 %
5	Kadar Abu	7,63 %
6	Kadar Lemak	5,10 %
7	Kadar Protein	34,51 %
8	Berat Molekul	6,14 -118,17 KDa

Hidrolisat protein ikan sapu-sapu yang dibuat dalam penelitian ini memiliki kadar protein yang sedang sebesar 34,51%, namun tidak memenuhi persyaratan mutu hidrolisat protein ikan komersil yang harus memiliki kadar protein sebesar 73,0-75,0% basis basah dan 75,26-78,95% basis kering (*International Quality Ingredients*, 2019). Hasil pengujian karakteristik HPI sapu-sapu dengan perlakuan pH dan lama hidrolisis yang berbeda serta standar HPI disajikan pada Lampiran 21.

#### 4.2.10 Asam Amino HPI Cair

Asam amino merupakan senyawa organik dengan gugus amina ( $-NH_2$ ), gugus karboksil ( $-COOH$ ) dan gugus R. Asam amino diklasifikasikan menjadi asam amino esensial (*indispensible*) dan non esensial (*dispensible*) (Suprayitno dan Sulistiyati, 2017). Perlakuan terbaik pada penelitian ini terdapat pada perlakuan pH 9 dengan lama hidrolisis 24 jam. Hasil terbaik ini kemudian dilakukan identifikasi komposisi asam amino dengan metode UPLC. Hasil komposisi asam amino HPI sapu-sapu (*Pterygoplichthys pardalis*) dibandingkan dengan HPI Nila (*Oreochromis niloticus*) (Foh *et al.*, 2011) dan HPI komersil (*International Quality Ingredients*, 2019) disajikan pada Tabel 10.

Berdasarkan Tabel 10, pengujian asam amino HPI sapu-sapu menghasilkan 15 jenis asam amino yang terdiri dari asam amino esensial dan non esensial. Jumlah asam amino ini mengindikasikan bahwa proses hidrolisis berjalan

kurang sempurna karena dimungkinkan masih adanya molekul protein yang saling berikatan. Menurut Annisa *et al.* (2017), identifikasi asam amino metode HPLC pada HPI nila dan bandeng hanya menampilkan 15 jenis asam amino karena proses hidrolisis tidak berjalan sempurna yang disebabkan molekul-molekul protein masih berikatan. Menurut Cholifah (2014), hidrolisis dikatakan sempurna apabila menghasilkan 18-20 jenis asam amino.

**Tabel 10.** Hasil Komposisi Asam Amino HPI Sapu-Sapu

Asam Amino		HPI Sapu-Sapu (%)	HPI Nila *) (%)	HPI Komersil **) (%)
<b>Esensial</b>				
1	L-Isoleusin	5,33	4,32	4,30
2	L-Leusin	9,14	9,23	7,10
3	L-Arginin	4,76	10,41	7,10
4	L-Lisin	10,32	-	7,50
5	L-Fenilalanin	4,28	4,37	3,70
6	L-Threonin	5,58	5,26	3,90
7	L-Valin	7,56	4,76	4,90
8	L-Histidin	2,33	2,42	2,10
<b>Total Esensial</b>		<b>49,30</b>	<b>40,77</b>	<b>40,60</b>
<b>Non Esensial</b>				
1	L-Alanin	6,14	7,71	6,50
2	L-Asam Aspartat	9,54	11,61	8,80
3	L-Asam Glutamat	12,35	21,03	13,50
4	Glisin	9,58	5,34	11,10
5	L-Serin	5,12	4,66	4,90
6	L-Prolin	2,84	6,44	5,60
7	L-Tirosin	5,14	2,47	-
<b>Total Non Esensial</b>		<b>50,71</b>	<b>59,26</b>	<b>50,40</b>

Sumber : \*) Foh *et al.* (2011).

\*\*) *International Quality Ingredients* (2019).

Asam amino esensial yang teridentifikasi pada sampel HPI sapu-sapu sebanyak 8 jenis meliputi isoleusin, arginin, leusin, lisin, fenilalanin, threonin, valin, dan histidin. Asam amino non esensial yang teridentifikasi pada sampel HPI sapu-sapu sebanyak 7 jenis meliputi alanin, asam aspartat, asam glutamat, glisin, serin, prolin, dan tirosin. Asam amino non esensial merupakan jenis asam amino yang dapat diproduksi oleh tubuh, sedangkan asam amino esensial tidak dapat diproduksi oleh tubuh sehingga perlu diperoleh dari luar melalui asupan makanan. Menurut Annisa *et al.* (2017), asam amino esensial (histidin, arginin, threonin,

valin, methionin, isoleusin, leusin, fenilalanin dan lisin) tidak dapat diproduksi oleh tubuh. Asam amino non esensial (asam aspartat, asam glutamat, serin, glisin, alanin dan tirosin) dapat diproduksi oleh tubuh.

Total asam amino esensial HPI sapu-sapu sebesar 49,30%, hasil ini lebih tinggi dibandingkan dengan total asam amino esensial HPI nila sebesar 40,77% (Foh *et al.*, 2011) dan HPI komersil sebesar 40,6% (*International Quality Ingredients*, 2019). Asam amino tertinggi pada penelitian ini yaitu asam amino non esensial glutamat sebesar 12,35%, hasil ini sesuai dengan HPI nila dengan kandungan asam glutamat tertinggi sebesar 21,03% (Foh *et al.*, 2011). Menurut Chalamaiah *et al.* (2012), sebagian besar HPI yang dilaporkan memiliki kandungan tertinggi asam amino jenis asam aspartat dan asam glutamat. Asam glutamat merupakan asam amino non esensial, berperan dalam menunjang fungsi otak, mempermudah belajar dan memperkuat ingatan. Asam glutamat juga bermanfaat untuk membantu dalam meningkatkan massa otot (memperbesar otot). Asam amino pembatas adalah asam amino esensial dengan kadar paling rendah dalam bahan, pada penelitian ini menghasilkan asam amino pembatas yaitu jenis histidin sebesar 2,33%. Hasil ini serupa dengan asam amino pembatas HPI cucut yaitu histidin sebesar 0,095% (Annisa *et al.*, 2017) dan HPI nila dengan histidin sebesar 2,42% (Foh *et al.*, 2011). Histidina merupakan asam amino esensial yang diperlukan untuk sintesis histamin. Sisteina merupakan prekursor dari taurin (Chalamaiah *et al.*, 2012).

## 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian mengenai karakteristik hidrolisat protein ikan sapu-sapu (*Pterygoplichthys pardalis*) menggunakan pH dan lama hidrolisis yang berbeda, diperoleh kesimpulan sebagai berikut:

- Perlakuan terbaik dalam pembuatan HPI sapu-sapu pada penelitian ini yaitu kombinasi pH 9 dan lama hidrolisis 24 jam. Karakteristik hidrolisat protein ikan sapu-sapu hasil perlakuan terbaik memiliki rendemen 57,39%, aktivitas antioksidan 63,99%, DH 40,67%, kadar air 7,28%, kadar abu 7,63%, kadar lemak 5,10%, kadar protein 34,51%, serta kisaran berat molekul 6,14 -118,17 KDa. Total asam amino esensial sebesar 49,30% dan asam amino non esensial sebesar 50,71%.

### 5.2 Saran

Saran yang dapat diberikan pada penelitian ini yaitu perlu memperbanyak variasi perlakuan, terutama pada perlakuan lama hidrolisis agar dapat diketahui fase stasioner hingga fase menurun pada laju hidrolisis HPI.



## DAFTAR PUSTAKA

- Achman, R, G. 1982. *Fatty Acid Composition in Fish Oil*. London : Academic Press.
- Molyneux, P. 2004. The use of the stable free radical dyhenylpicrylhydrazil (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, **26**: 211-219.
- Aksari Y. D., D. Perwitasari dan N. A. Butet. 2016. Kandungan logam berat (Cd, Hg, dan Pb) pada ikan sapu-sapu, *Pterygoplichthys pardalis* (Castelneau, 1855) di Sungai Ciliwung. *Jurnal Iktiologi Indonesia*. **15** (3): 257-266.
- Anggraini, A dan Yunianta. 2015. Pengaruh suhu dan lama hidrolisis enzim papain terhadap sifat kimia, fisik dan organoleptik sari edamame. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. **3** (3): 1015-1025.
- Annisa S., Y. S. Darmanto dan U. Amalia. 2017. Pengaruh perbedaan spesies ikan terhadap hidrolisat protein ikan dengan penambahan enzim papain. *Indonesian Journal of Fisheries Science and Technology (IJFST)*, **13** (1): 24-30.
- Anwar, L. O. dan Rosmawati. 2013. Karakteristik hidrolisat protein tambelo (*Bactronophorus* sp.) yang dihidrolisis menggunakan enzim papain. *Biogenesis*. **1** (2): 133-140.
- AOAC. 2005. *Official methods of analysis*. Washington DC: Association of Official Analytical Chemists.
- Baehaki, A., S. D. Lestari, dan A. R. Romadhoni. 2015. Hidrolisis protein ikan patin menggunakan enzim papain dan aktivitas antioksidan hidrolisatnya. *JPHPI*, **18** (3) : 230-239.
- Bautista, I. 1999. Recovery of proteins from fish waste products by alkaline extraction. *Eur Food Res Technol*. **210** : 84–89.
- Belkaaloul, A., A. Checroun, A. I. Ait- Abdesalam, D. Saidi and O. Kheroua. 2010. Growth, acidification and proteolysis performance of two co-cultures (*Lactobacillus plantarum*-*Bifidobacterium longum* and *Streptococcus thermophilus bifido-bacterium longum*). *African Journal of Biotechnology*, **9** (10): 1463-1469.
- Bhatty, R.S. 1985. Comparison of the soxtec and goldfish systems for determination of oil in grain species. *Can Inst Food Sci Technol J*. **18** (2): 181-184.
- Bueno-Solano, C., J. Lopez-Cervantes, O. N. Campas-Baypoli, R. Lauterio-Garcia, N. P. Adan-Bante and D. I. Sanchez-Machado. 2009. Chemical and biological characteristics of protein hydrolysates from fermented shrimp by-products. *Food Chemistry*. **112**: 671–675.
- Chaidir, A. 2001. Pengaruh pencucian daging lumat (*minched fish*) ikan sapu-sapu (*Hypostomus* sp) terhadap kualitas *minched fish* dalam pembuatan bakso ikan. *Skripsi*. Bogor : FPIK, IPB.

- Chalamaiah, M., B. D. Kumar, R. Hemalatha and T. Jyothirmayi. 2012. Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. *Food Chemistry*. **135**: 3020-3038.
- Cholifah. 2014. Produksi dan Karakterisasi Hidrolisat Jeroan Ikan Kakap Putih (*Lates calcarifer*). *Skripsi*. Bogor: Departemen Teknologi Hasil Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor.
- Damodaran, S. 1996. *Amino Acids, Peptides and Protein 3<sup>th</sup> Edition*. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Dewita dan Syahrul. 2010. Kajian mutu konsentrat protein ikan patin (*Pangasius Sp*) yang diolah dengan metode berbeda selama penyimpanan suhu kamar. *Jurnal Natur Indonesia* in press.
- Dissanayake, M. and T. Vasiljevic. (2009). Functional properties of whey proteins affected by heat treatment and hydrodynamic highpressure shearing. *Journal of Dairy Science*. **92**: 1387–1397.
- Donkor, O. N., L. Stojanovska, P. Ginn, J. Ashton and T. Vasiljevic. 2012. Germinated grains – Sources of bioactive compounds. *Food Chemistry* **135** (3): 950-959.
- Elfahri, K. R., O. N. Donkor and T. Vasiljevic. 2014. Potential of novel *Lactobacillus helveticus* strains and their cell wall bound proteases to release physiologically active peptides from milk proteins. *International Dairy Journal*. **38** (1): 37-46.
- Elias, R. J., S. S. Kellerby and E. A Decker. 2008. Antioxidant activity of proteins and peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **48** (5): 430–441
- Foh, M. B. K., M. T. Kamara, I. Amadou, B. M. Foh and X. Weshui. 2011. Chemical and physicochemical properties of tilapia (*Oreochromis niloticus*) fish protein hydrolysate and concentrate. *International Journal of Biological Chemistry*, **5** (1): 21-36.
- Gaspersz, V. 1995. *Teknik Analisis dalam Penelitian Percobaan*. Bandung: Tarsito.
- Gesualdo, A. M. L. and E.C.Y. Li-Chan. 1999. Functional properties of fish protein hydrolysate from Herring (*Clupea harengus*). *Journal of Food Science*. **64**: 1000–1004.
- Guerard, F., N. Decourcelle, C. Sabourin, C. Floch-Laizet, L. Le Grel, P. Le Floch, F. Gourlay, R. Le Delezir, P. Jaouen and P. Bourseau. 2010. Recent developments of marine ingredients for food and nutraceutical applications: A review. *Journal of Science of Halieutique Aquatique*. **2**: 21–27.
- Hadiaty, R. K. 2011. Diversitas dan hilangnya jenis-jenis ikan di sungai Ciliwung dan Sungai Cisadane. *Berita Biologi*. **10** (4): 491-504.
- Hasnaliza, H., M. Y. Maskat, A. W. M. Wan and S. Mamot. 2010. The effect of enzyme concentration, temperature and incubation time on nitrogen content and degree of hydrolysis of protein precipitate from cockle (*Anadara granosa*) meat wash water. *International Food Research Journal*, **17** : 147-152.

- Hastarini, E., D. Fardiaz, H. E. Irianto dan S. Budijanto. 2012. Karakteristik minyak ikan dari limbah pengolahan filet ikan patin siam (*Pangasius hypopthalmus*) dan patin jambal (*Pangasius djambal*). *Agritech*, **32** (4): 403-410.
- Hoa, M.X. and T. B. Lam. 2008. Optimization of enzymatic hydrolysis of viscera of Pangasiidae to obtain calcium-binding protein hydrolysate. *Vietnam Journal of Agriculture and Rural Development*, **38**: 124-132.
- Hoyle, N. T. and J. H. Merritt. 1994. Quality of fish-protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*). *Journal of Food Science*. **59** (1): 76-79.
- Hsu, K. (2010). Purification of antioxidative peptides prepared from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle by-product. *Food Chemistry*. **122**: 42–48.
- Indrawaty T. 1983. *Pembuatan Kecap Keong Sawah dengan Menggunakan Enzim Bromelin*. Jakarta: Balai Pustaka.
- International Quality Ingredients*. 2019. Fish Protein Hydrolysate. <http://www.eyequye.ni>. Diakses pada 24 Januari 2019.
- Jaczynski, J. 2008. *Protein and lipid recovery from food processing by-products using isoelectric solubilization/precipitation*, in KN Papadopoulos (ed.). New York: Food Chemistry Research Developments Nova Science Publishers, Inc.
- Jaedun, A. 2011. *Metodologi Penelitian Eksperimen*. UNY : Puslit Dikdasmen.
- Jamil, N. H, Halim N. R. A, dan Sarbon N. M. 2016. Optimization of enzymatic hydrolysis condition and functional properties of eel (*Monopterus* sp.) protein using Response Surface Methodology (RSM). *International Food Research Journal*, **23** (1): 1-9.
- Je, J. Y., Z. Qian, H. Byun and S. Kim. 2007. Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. *Process Biochemistry*. **42** : 840–846.
- Jensen, I. J., A. Hogné, H. K. Maehre and E. O. Elvevoll. 2009. Changes in antioxidative capacity of saithe (*Pollachius virens*) and shrimp (*Pandalus borealis*) during in vitro digestion. *J Agric Food Chem*, **57** (22): 10928-32.
- Jun, S. Y., P. J. Park and W. K. Jung. 2004. Purification and characterization of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysate of yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein. *Eur Food Res Technol*, **219** : 20–26.
- Kerlinger, F. 1973. *Foundations of Behavioral Research (2<sup>nd</sup> Edition)*. Holt : Rinehart and Winston.
- Kotella, M., A. J. Whitten, S. N. Kartikasari and S. Wirjoatmodjo. 1993. *Freshwater Fishes of Western Indonesia and Sulawesi*. Hongkong: Periplus Edition. 344 p.
- Kristinsson, H. G. And B. A. Rasco. 2000. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **40** (1): 43-81.
- Latifah, A. 2013. Aktivitas antioksidan dan komponen bioaktif hidrolisat protein jeroan ikan kakap putih (*Lates calcalifer*). *Skripsi*. Bogor: FPIK, IPB.

- Lombu, V. Farah, A. T. Agustin and E. V. Pandey. 2015. Pemberian konsentrasi asam asetat pada mutu gelatin kulit ikan tuna. *Jurnal Media Teknologi Hasil Perikanan*, **2** (3).
- Mahdiah, E. 2002. Pengaruh penambahan bahan pengikat terhadap karakteristik fisik otak-otak ikan sapu-sapu (*Liposarcus pardalis*). *Skripsi*. Bogor: FPIK, IPB.
- Marchbank, T., J. K. Limdi, A. Mahmood, G. Elia and R. J. Playford. 2008. Clinical trial: Protective effect of a commercial fish protein hydrolysate against indomethacin (NSAID)-induced small intestinal injury. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. **28**: 799–804.
- Meldstad, F. 2015. Hydrolysis of Marine Cod (*Gadus morhua*) head. *Thesis*. NTNU, Faculty of Natural Sciences, Department of biotechnology. Trondheim: Norwegian University of Science and Technology.
- Moroni, F. T., A. C. Ortega, R. B. Moroni, B. Mayag, R. S. de Jesus and E. Lessi. 2015. Limitations in decision context for selection of amazonian armoured catfish acari-bodó (*Pterygoplichthys pardalis*) as candidate species for aquaculture. *International Journal of Fisheries and Aquaculture*. **7** (8): 142-150
- Munandar, K. dan N. Eurika. 2016. Keanekaragaman ikan yang bernilai ekonomi dan kandungan logam berat Pb dan Cd pada ikan sapu-sapu di Sungai Bedadung Jember. *Proceeding Biology Education Conference*, **13** (1): 717-722.
- Nalinanon, S., S. Benjakul, H. Kishimura and F. Shahidi. 2011. Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from the muscle of ornate threadfin bream treated with pepsin from skipjack tuna. *Food Chemistry*, **124**: 1354-1952.
- Nazeer, R. A., R. Deeptha, R. Jaiganesh, N. S. Sampathkumar, and S. Y. Naqash. 2011. Radical scavenging activity of Seela (*Sphyræna barracuda*) and Ribbon fish (*Lepturacanthus savala*) backbone protein hydrolysates. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. **17**: 209–216.
- Nesse, K. O., A. P. Nagalakshmi, P. Marimuthu, and M. Singh. 2011. Efficacy of a fish protein hydrolysate in malnourished children. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. **26** (4): 360-365.
- Nico, L. G. dan R. T. Martin. 2012. The South American armored catfish, *Pterygoplichthys anisitsi* (Pisces: Loricariidae), in Teas, with comment on foreign fish introduction in the American Southwest. *The Southwestern Naturalist*. **46** (1): 98-104.
- Nurdiani R., M. Dissanayake, W. E. Street, O. N. Donkor, T. K. Singh and T. Vasiljevic. 2015. Sustainable use of marine resources – turning waste into food ingredients. *International Journal of Food Science and Technology*. **50**: 2329-2339.
- Nurdiani, R., M. Dissanayake, W. E. Street, O. N. Donkor, T. K. Singh and T. Vasiljevic. 2016. In vitro study of selected physiological and physicochemical properties of fish protein hydrolysates from 4 Australian fish species. *International Food Research Journal*. **23** (5): 2042-2052.



- Nurdyansyah F. dan U. H. A. Hasbullah. 2018. Optimasi fermentasi asam laktat oleh *Lactobacillus casei* pada media fermentasi yang disubstitusi tepung kulit pisang. *Journal of Biology*, **11** (1): 64-71.
- Pacheco-Aguilar, R., M. A. Mazorra-Manzano and J. C. Ramirez-Suarez. 2008. Functional properties of fish protein hydrolysates from Pacific Whiting (*Merluccius productus*) muscle produced by a commercial protease. *Food Chemistry*. **109**: 782–789.
- Purbasari, D. 2008. Produksi dan karakterisasi hidrolisat protein dari kerang mas ngur (*Atactodea striata*). *Skripsi*. Bogor: Program Studi Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor.
- Putra, A. R. P. 2012. Optimasi produksi lipase dengan variasi konsentrasi substrat dan suhu melalui fermentasi rendam *Rhodotorula mucilaginosa* (YUICC442) menggunakan *Respon Surface Methodology*. *Skripsi*. Depok: Teknologi Bioproses, Departemen Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Indonesia.
- Putri, D. E. 2001. Pengaruh pemanasan pada penanganan ikan sapu-sapu (*Hypostomus* sp) terhadap mutu fisik bakso ikan yang dihasilkan. *Skripsi*. Bogor: Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor.
- Qoyyimah, F. D., D. Elfidabari dan M. R. Fahmi. 2016. Identifikasi ikan sapu-sapu (*Loricariidae*) berdasarkan karakter pola abdomendi perairan Ciliwung. *Jurnal Biologi*. **20** (1): 40-43.
- Rao K. R. and V. Sunchu. 2017. A report on *Pterygoplichthys pardalis* Amazon sailfin suckermouth Catfishes in Freshwater tanks at Telangana state, India. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*. **5** (2): 249-254.
- Ratnawati, S. E., N. Ekantari, R. W. Pradipta dan B. L. Paramita. 2017. Aplikasi *Response Surface Methodology* (RSM) pada Optimasi Ekstraksi Kalsium Tulang Lele. *Jurnal Perikanan UGM*, (1): 41-48.
- Reed, G. 1975. *Enzymes in Food Processing*. New York: Academic Press.
- Ren, J., M. Zhao, J. Shi, J. Wang, Y. Jiang, C. Cui, Y. Kakuda and S. J. Xue. 2008. Purification and identification of antioxidant peptides from grass carp muscle hydrolysates by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. *Food Chemistry*. **108** : 727–736.
- Riansyah, A, A. Supriadi, dan R. Nopianti. 2013. Pengaruh perbedaan suhu dan waktu pengeringan terhadap karakteristik ikan asin sepat siam (*Trichogaster pectoralis*) dengan menggunakan oven. *Fishtech*, **2** (1): 53-68.
- Rutherford, S. M. 2010. Methodology for determining degree of hydrolysis of protein hydrolysates: a review. *Journal of AOAC International*. **93** (5) :1515-1522.
- Sarmadi, B. .H dan A. Ismail. 2010. Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides*, **31** (10): 1949-1956.

- Setiawati, 2009. Analisis sifat fisik, kimia dan fungsional gelatin yang diekstrak dari kulit dan tulang pari. *Skripsi*. Bogor: Fakultas Teknologi Pertanian, IPB.
- Shahidi, F., Han dan J. Synowiecki. 1995. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). *Food Chemistry*, **53**: 285–293.
- Singh, A. and S. Benjakul. 2018. Proteolysis and its control using protease inhibitors in fish and fish products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **17**: 496-509.
- Slizyte, R. 2004. Hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by products: Influence of raw material composition and process conditions. *Thesis*. NTNU, Faculty of Natural Sciences, Department of biotechnology. Trondheim: Norwegian University of Science and Technology.
- Slizyte, R., R. Mozuraityte, O. Martínez-Alvarez, E. Falch, M. Fouchereau-Peron and T. Rustad. 2009. Functional bioactive and antioxidative properties of hydrolysates obtained from cod (*Gadus morhua*) backbones. *Process Biochemistry*, **44** (6): 668-77.
- Souissi, N., A. Bougatef, Y. Triki-Ellouz and M. Nasri. 2007. Biochemical and functional properties of Sardinelle (*Sardinella aurita*) by-product hydrolysates. *Food Technology and Biotechnology*. **45**: 187–194.
- Stansby, M. E. and Olcott. 1963. *Compositon of Fish*. New York: Reinhold
- Suprayitno, E. dan T. D. Setijawati. 2017. *Metabolisme Protein*. Malang: UB Press.
- Susanto DA. 2004. *Pleco, Sapu-sapu Hias Eksotis*. Jakarta : Penebar Swadaya.
- Tarigan, S. A. 2004. Pemanfaatan Ikan Sapu-Sapu (*Hyposarcus pardalis*) sebagai usaha peningkatan nilai tambah produk simping Purwakarta. *Skripsi*. Bogor: FPIK, IPB.
- Thirzano, Yudie. 2011. Ledakan populasi ikan sapu-sapu akibatkan sedimentasi sungai. *Makalah*.
- Trisnawati, R. 2007. Pemanfaatan surimi ikan sapu-sapu (*Hyposarcus pardalis*) dalam pembuatan empek-empek. *Skripsi*. Bogor : FPIK, IPB.
- Tunjungsari, R. M. 2007. Pemanfaatan ikan sapu-sapu (*Hyposarcus pardalis*) dalam pembuatan keripik ikan. *Skripsi*. Bogor: FPIK, IPB.
- Utomo, B. S. B., Suryaningrum T. D. dan Hrianto . 2014. Optimization of enzymatic hydrolysis of protein hydrolisate processing from waste of catfish filet production. *Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology*, **9** (3): 107-114.
- Wijaya, H. 2001. Pengaruh Konsentrasi Asam Asetat dan Lama Perendaman Kulit Ikan Pari (*Trygon sp*) Pada Pembuatan Gelatin. *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Wijayanti, I., Romadhon dan L. Rianingsih. 2015. Pengaruh konsentrasi enzim papain terhadap kadar proksimat dan nilai rendemen hidrolisat protein ikan bandeng (*Chanos chanos* Forskka). *Pena Akuatika*, **12** (1): 13-23.



- Wijayanti, I., Romadhon dan L. Rianingsih. 2016. karakteristik hidrolisat protein ikan bandeng (*Chanos chanos* Forsk) dengan konsentrasi enzim bromelin yang berbeda. *Indonesian Journal of Fisheries Science and Technology*, **11** (2) : 129-133.
- Winarno FG. 1997. *Kimia Pangan dan Gizi*. Jakarta: PT. Gramedia.
- Witono Y. A. dan Achmad S. 2007. Karakterisasi hidrolisat protein kedelai hasil hidrolisis menggunakan protease dari tanaman biduri. *Jurnal Penelitian Hayati*, **13**: 7-13.
- Yamin , N., N. N. Palinggi dan Rachmansyah. 2008. Aktivitas enzim protease dalam lambung dan usus ikan kerapu macan setelah pemberian pakan. *Media Akuakultur*. **3** (1) : 40-44.
- You, L., M. Zhao, J. M. Regenstein and J. Ren. 2010. Purification and identification of antioxidative peptides from loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. *Food Research International*. **43** : 1167–1173.
- Zamora, R. dan Hidalgo, F. J. 2001. Inhibition of proteolysis in oxidized lipid-damaged proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49** (12): 6006–6011.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Proses Pembuatan HPI Sapu-Sapu (*Pterygoplichthys pardalis*)



Pengambilan sampel di Sungai Rahu Blitar



Sampel ikan sapu-sapu



Ikan dihaluskan dengan penggiling daging



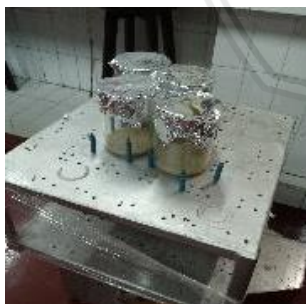
Pengkondisian pH sesuai perlakuan dengan menambah HCL 6N atau NaOH 6N



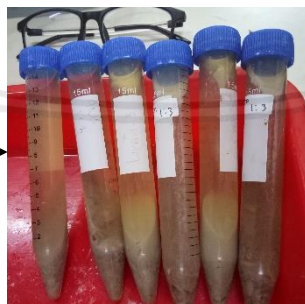
Ditambahkan akuades dengan perbandingan sesuai perlakuan



Sampel ditimbang



Sampel diinkubasi pada suhu ruang, lama hidrolisis sesuai perlakuan



Sampel dimasukkan kedalam cuvet



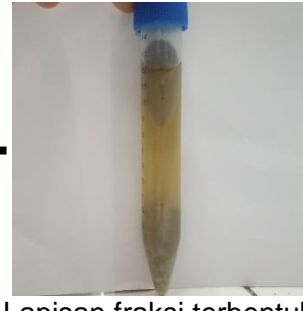
Sampel disentrifugasi kecepatan 3000 rpm selama 30 menit



Fraksi protein terlarut merupakan HPI



Dipisahkan tiap fraksinya



Lapisan fraksi terbentuk



Penyerbukkan HPI dengan alat *spray dryer*

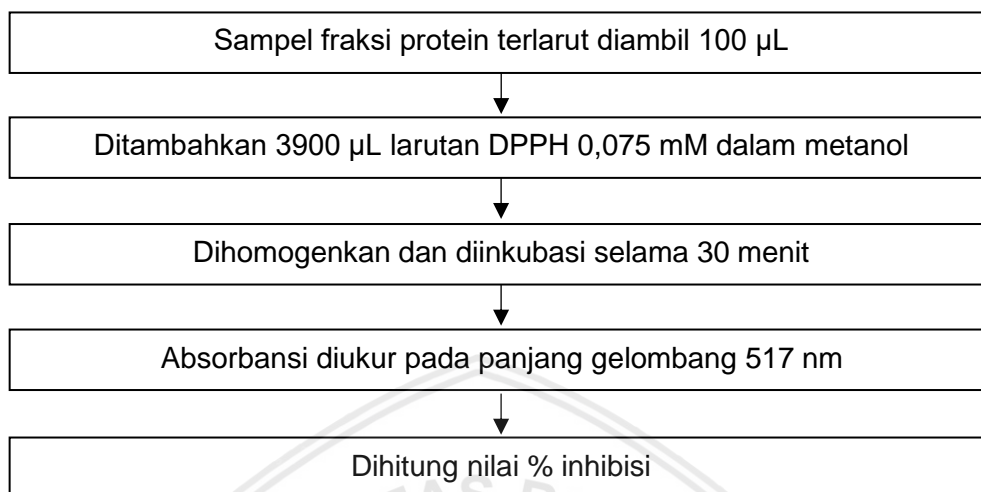


Hasil serbuk kering HPI sapu-sapu

Dilakukan pengujian parameter rendemen, antioksidan, DH, kadar protein, dan asam amino.

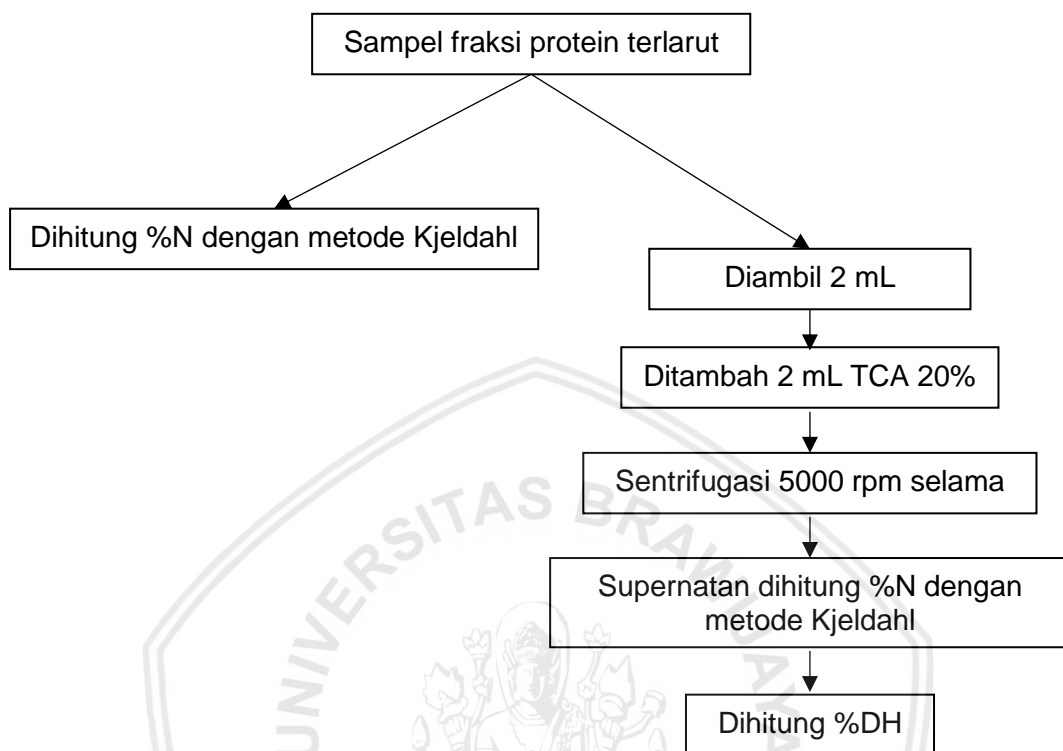
Dilakukan pengujian parameter kadar air, kadar abu dan kadar lemak.

Lampiran 2. Diagram Alir Pengujian Aktivitas Antioksidan (Donkor *et al.*, 2012 dengan modifikasi)



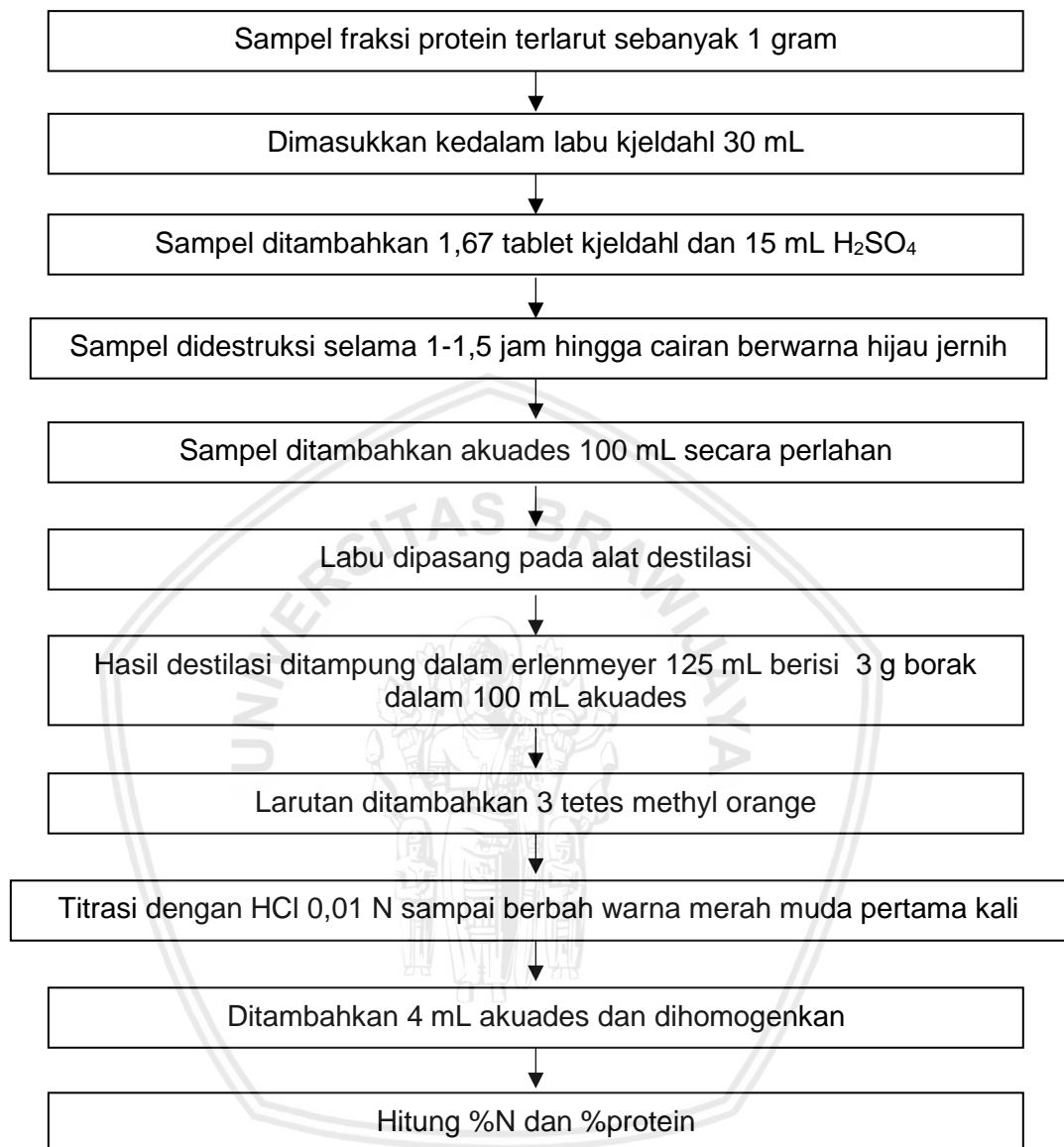
$$\% \text{ inhibisi} = \frac{(\text{Absorbansi blangko} - \text{absorbansi sampel})}{\text{Absorbansi blangko}} \times 100$$

Lampiran 3. Diagram Alir Pengujian Derajat Hidrolisis (Hoyle and Merritt, 1994 dengan modifikasi)



$$\% DH = \frac{(\text{Total N dalam TCA 20\%})}{\text{Total N dalam sampel}} \times 100\%$$

Lampiran 4. Diagram Alir Pengujian Kadar Protein (AOAC, 2005)

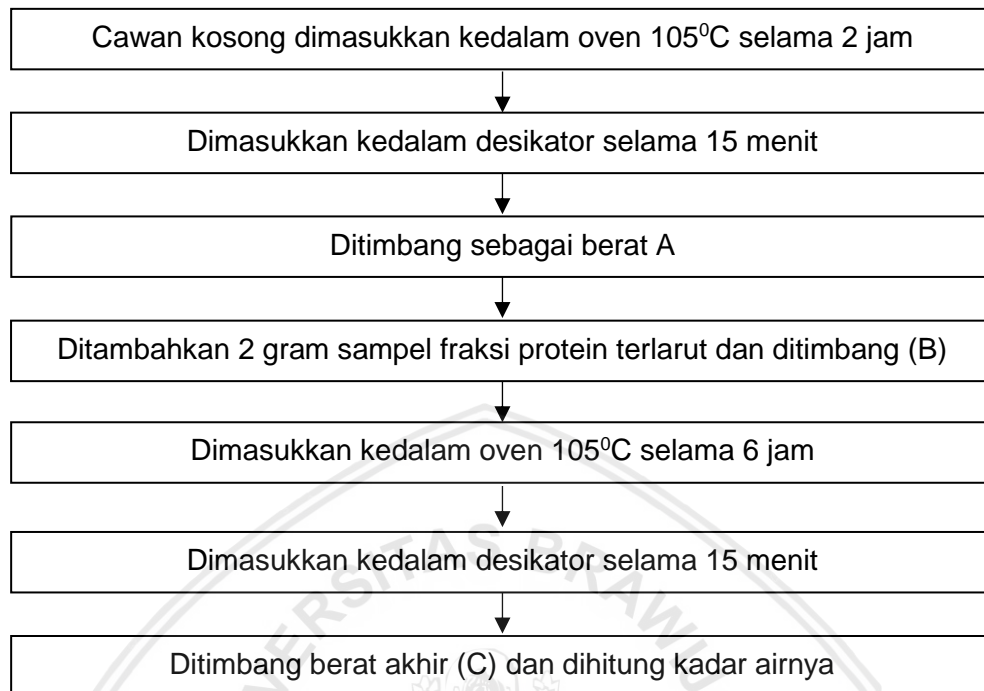


$$\% N = \frac{(\text{mL HCl} - \text{mL blanko}) \times 14,007 \times N \text{ HCl}}{\text{mg sampel}} \times 100\%$$

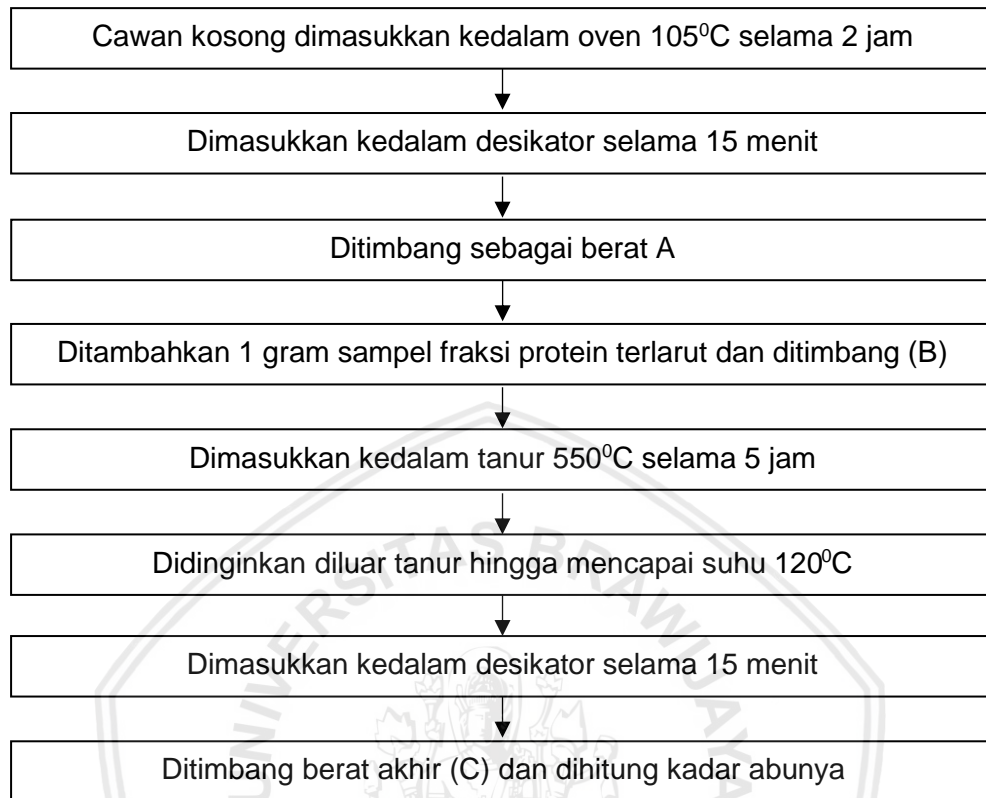
$$\% \text{Protein} = \%N \times 6,25$$



Lampiran 5. Diagram Alir Pengujian Kadar Air (AOAC, 2005)

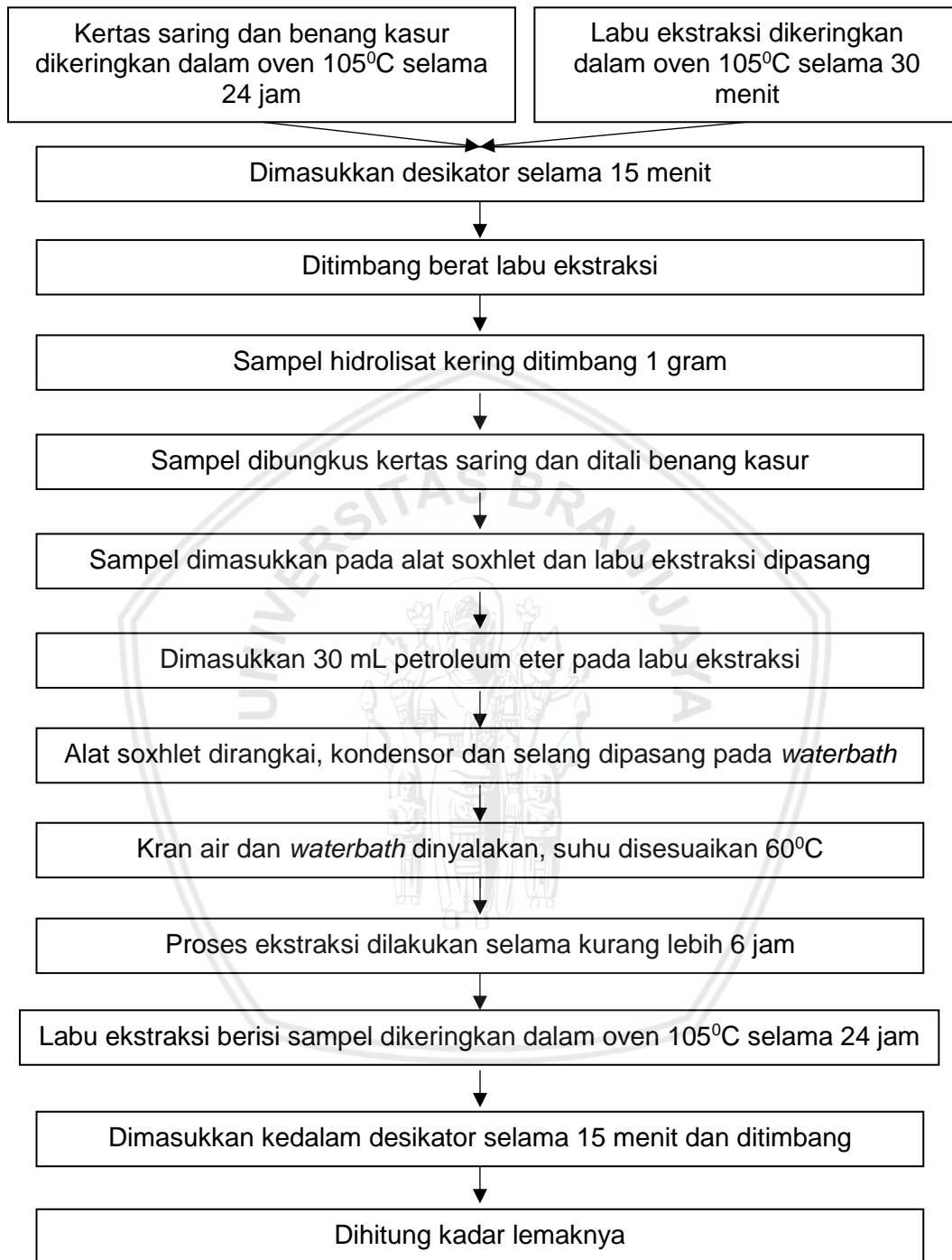


$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{(A+B) - C}{B} \times 100\%$$

**Lampiran 6.** Diagram Alir Pengujian Kadar Abu (AOAC, 2005)

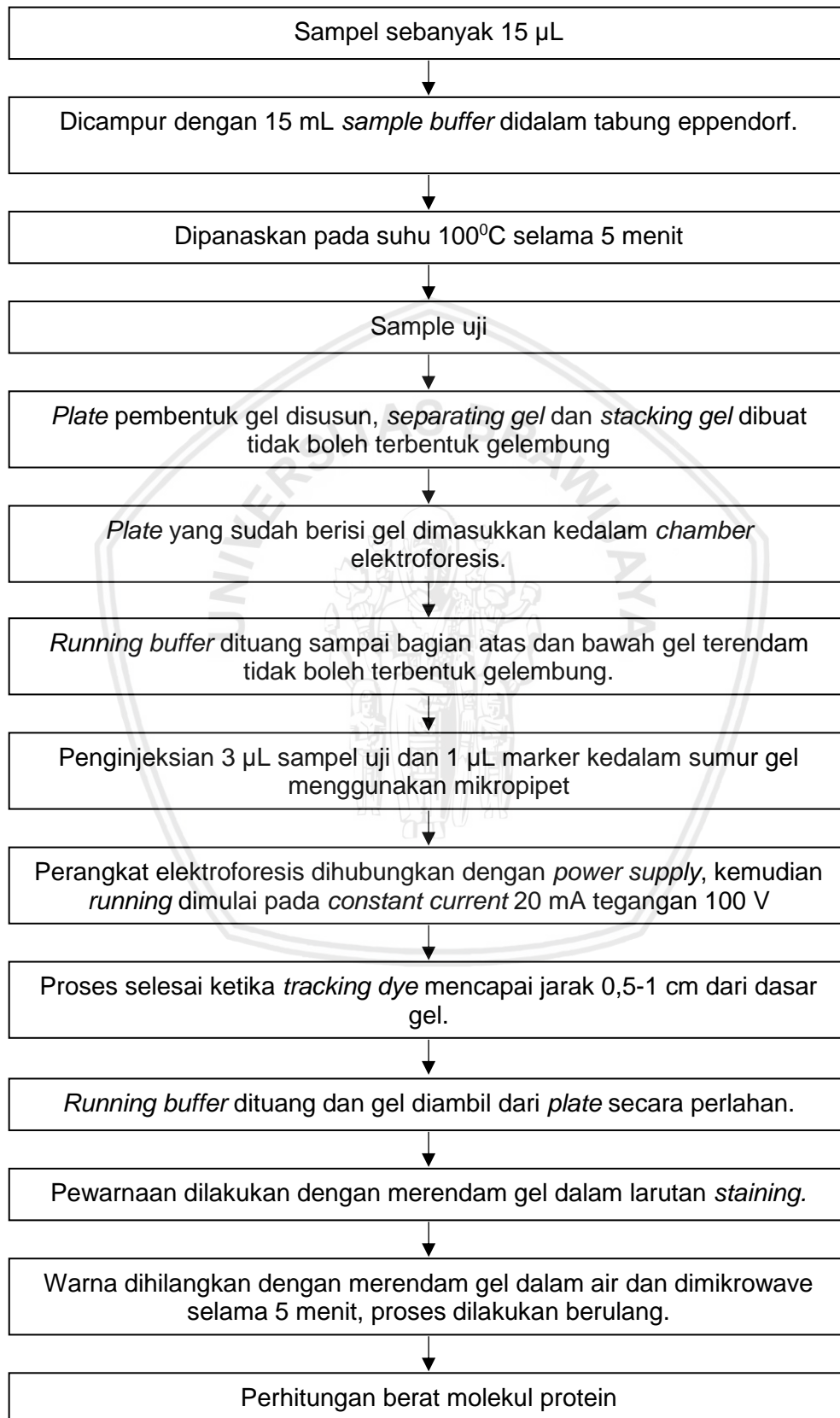
$$\text{Kadar abu (\%)} = \frac{C - A}{B - A} \times 100\%$$

Lampiran 7. Diagram Alir Pengujian Kadar Lemak (AOAC, 2005)

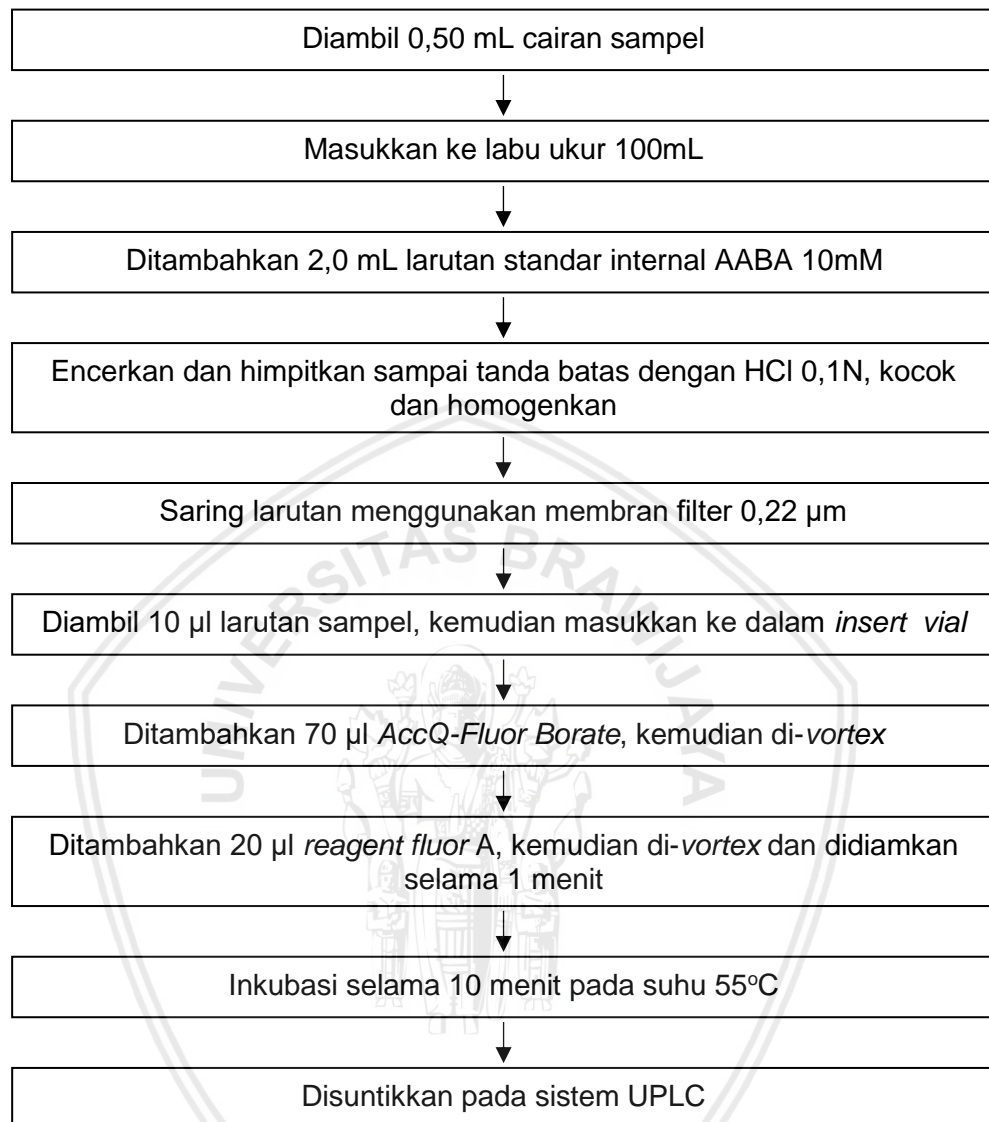


$$\text{Kadar lemak (\%)} = \frac{(\text{Berat Labu Ekstraksi akhir}) - (\text{Berat Labu Ekstraksi awal})}{\text{Berat sampel}} \times 100\%$$

Lampiran 8. Diagram Alir Pengujian Berat Molekul SDS-PAGE (Dissanayake dan Vasiljevic, 2009 dengan modifikasi)



Lampiran 9. Diagram Alir Pengujian Asam Amino UPLC (SIG, 2012)



**Lampiran 10.** Perhitungan dalam Pembuatan Larutan

**a) Larutan Asam HCl 6 N (Wijaya, 2001 dengan modifikasi)**

Larutan dibuat untuk pengenceran dalam 100 mL akuades.

$$\text{Mr NaOH} = 40$$

$$N = \frac{g}{\text{Mr}} \times \frac{1000}{V}$$

$$6 = \frac{g}{40} \times \frac{1000}{100}$$

$$g = 24 \text{ gram}$$

**b) Larutan Basa NaOH 6 N (Wijaya, 2001 dengan modifikasi)**

Larutan dibuat untuk pengenceran dalam 100 mL akuades dan berasal dari HCl pekat 37%

$$\text{Berat jenis (BJ) HCl} = 1,19$$

$$\text{Berat molekul (BM) HCl} = 36,5$$

$$\begin{aligned} N &= \frac{[(10 \times \% \times \text{BJ}) \text{Valensi}]}{\text{BM}} \\ &= \frac{[(10 \times 37\% \times 1,19) 1]}{36,5} \\ &= 12,06 \text{ N} \end{aligned}$$

- Pengenceran

$$N_1 \cdot V_1 = N_2 \cdot V_2$$

$$12,06 \cdot V_1 = 6 \cdot 100$$

$$V_1 = 49,75 \text{ mL}$$

**c) Larutan DPPH 0,075 mM (Nurdiani *et al.*, 2016 dengan modifikasi)**

Larutan dibuat untuk pengenceran dalam 100 mL metanol.

$$\text{Mr DPPH} = 294,3$$

$$0,075 \text{ mM} = 0,075 \times 10^{-3}$$

$$\text{Volume } 100 \text{ mL} = 0,1 \text{ L}$$

$$M = \frac{\text{Mol}}{V}$$

$$0,075 \times 10^{-3} = \frac{\text{mol}}{0,1}$$

$$\text{mol} = 7,5 \times 10^{-6}$$

$$\text{Mol} = \frac{g}{\text{Mr}}$$

$$7,5 \times 10^{-6} = \frac{g}{394,3}$$

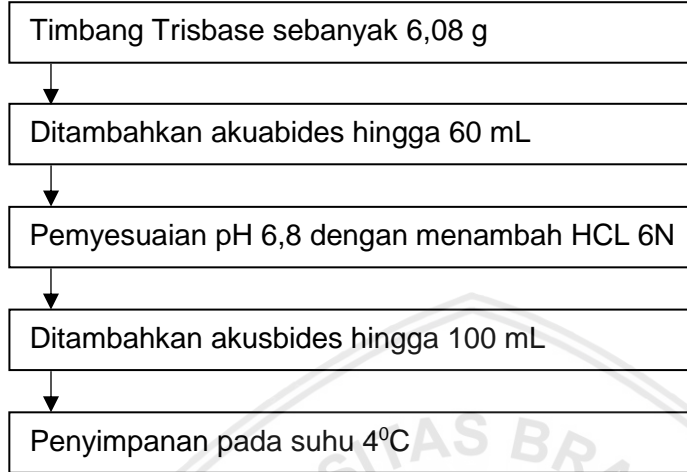
$$g = 0,002$$



**Lampiran 11.** Perhitungan dan komposisi larutan SDS-PAGE

**a) 0,5 Tris-HCl pH 6,8**

Larutan dibuat sebanyak 100 mL dengan langkah sebagai berikut:



Perhitungan :

$$\text{Mr Trisbase} = 121,14$$

$$\text{Volume } 100 \text{ mL} = 0,1 \text{ L}$$

$$M = \frac{\text{Mol}}{V}$$

$$0,5 = \frac{\text{mol}}{0,1}$$

$$\text{mol} = 0,05$$

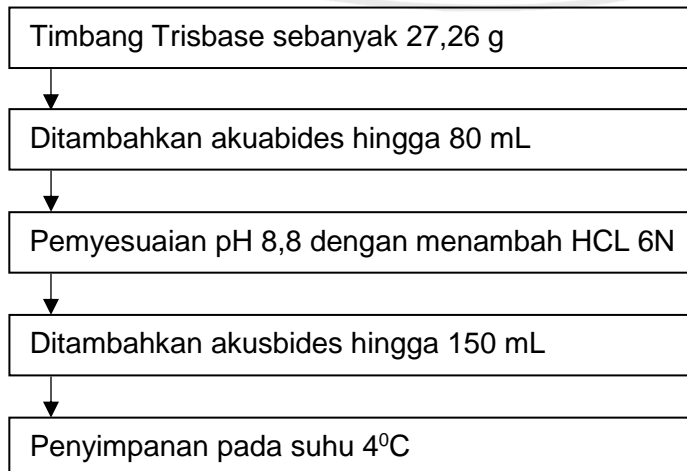
$$\text{Mol} = \frac{g}{\text{Mr}}$$

$$0,05 = \frac{g}{121,14}$$

$$g = 6,06$$

**b) 0,5 Tris-HCl pH 6,8**

Larutan dibuat sebanyak 150 mL dengan langkah sebagai berikut:



Perhitungan :

$$\text{Mr Trisbase} = 121,14$$

$$\text{Volume 150 mL} = 0,15 \text{ L}$$

$$M = \frac{\text{Mol}}{V}$$

$$1,5 = \frac{\text{Mol}}{0,15}$$

$$\text{Mol} = 0,225$$

$$\text{Mol} = \frac{g}{\text{Mr}}$$

$$0,225 = \frac{g}{121,14}$$

$$g = 27,26$$

**c) Acrylamide/Bis (30% T; 2,67% C)**

Larutan dibuat sebanyak 100 mL dengan langkah sebagai berikut:

Timbang Acrylamide sebanyak 29,2 g

Timbang N'N'-bis-methylene-acrilamide sebanyak 0,8 g

Dihomogenkan dalam 100 mL akuabides

Dimasukkan botol gelap atau pakai alufo

Penyimpanan pada suhu 4°C

**d) 10x SDS-PAGE**

Larutan dibuat sebanyak 100 mL dengan langkah sebagai berikut:

Timbang Trisbase sebanyak 3,03 g

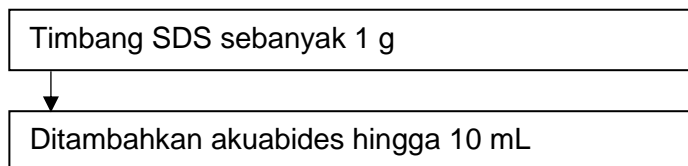
Timbang Glycine sebanyak 14,41 g

Timbang SDS sebanyak 1 g

Ditambahkan akuabides hingga 100 mL

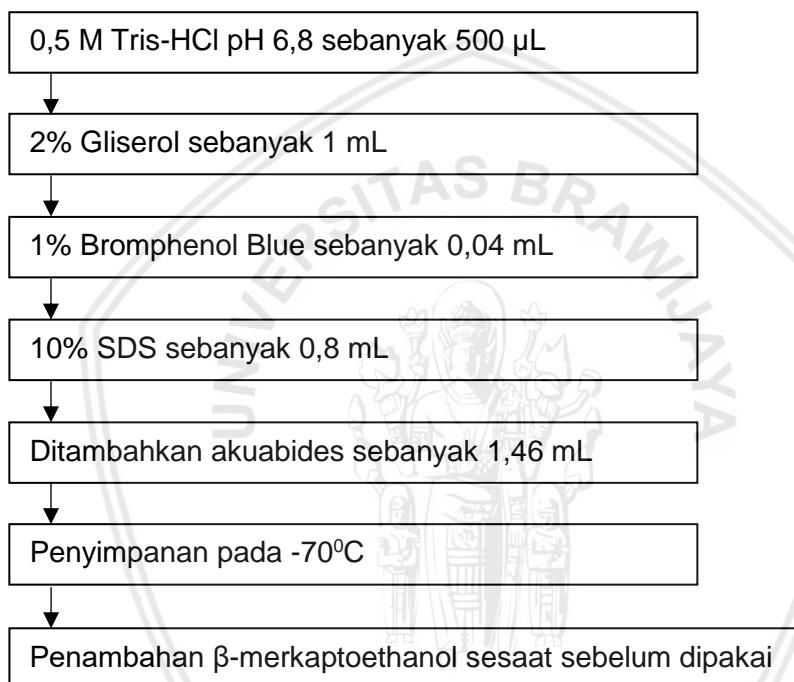
**e) 10% SDS**

Larutan dibuat sebanyak 10 mL dengan langkah sebagai berikut:



**f) SDS-PAGE *Sample Buffer***

Larutan dibuat sebanyak 4 mL sebanyak 2x dengan langkah sebagai berikut:



**g) Komposisi Gel**

	<b>Separating gel 12%</b>	<b>Stacking gel</b>
Akuabides	3,1 mL	1,7 mL
30% Acrilamide/Bis	4,2 mL	0,5 mL
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	2,5 mL	-
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	-	0,7 mL
10% SDS	0,1 mL	0,03 mL
APS	0,1 mL	0,1 mL
TEMED	4 µL	3 µL

**h) Larutan Staining**

Timbang *Commisie Brilliant Blue R-250* sebanyak 1 g

Ditambahkan metanol sebanyak 450 mL

Ditambahkan asam asetat glacial sebanyak 100 mL

Ditambahkan akuabides 450 mL



**Lampiran 12.** Analisa Sidik Ragam Pengaruh Lama Hidrolisis dan pH terhadap Rendemen Hidrolisat Protein Ikan Sapu-Sapu

**Analysis of Variance**

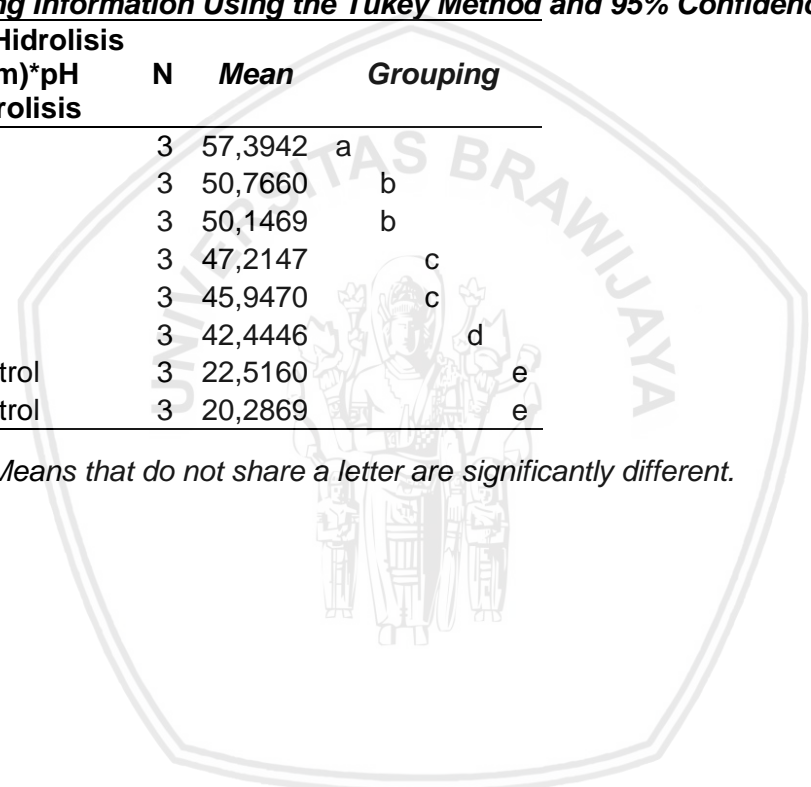
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Lama Hidrolisis (Jam)	1	233,06	233,06	366,80	0,000
pH Hidrolisis	3	3535,85	1178,62	1854,96	0,000
Lama Hidrolisis (Jam)*pH Hidrolisis	3	53,65	17,88	28,14	0,000
Error	16	10,17	0,64		
Total	23	3832,73			

❖ P-Value < 0,05 (P<0,05) = berbeda nyata, maka uji lanjut Tukey

**Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence**

Lama Hidrolisis (Jam)*pH Hidrolisis	N	Mean	Grouping
24 9,0	3	57,3942	a
24 7,0	3	50,7660	b
24 5,0	3	50,1469	b
12 9,0	3	47,2147	c
12 7,0	3	45,9470	c
12 5,0	3	42,4446	d
24 Kontrol	3	22,5160	e
12 Kontrol	3	20,2869	e

❖ Means that do not share a letter are significantly different.



**Lampiran 13.** Analisa Sidik Ragam Pengaruh Lama Hidrolisis dan pH terhadap Nilai Penghambatan Radikal Bebas Hidrolisat Protein Ikan Sapu-Sapu

**Analysis of Variance**

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Lama Hidrolisis (Jam)	1	1852,19	1852,19	1640,53	0,000
pH Hidrolisis	3	6451,32	2150,44	1904,69	0,000
Lama Hidrolisis (Jam)*pH Hidrolisis	3	481,10	160,37	142,04	0,000
Error	16	18,06	1,13		
Total	23	8802,68			

❖ P-Value < 0,05 (P<0,05) = berbeda nyata, maka uji lanjut Tukey

**Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence**

Lama Hidrolisis (Jam)*pH Hidrolisis	N	Mean	Grouping
24 9,0	3	63,9888	a
24 7,0	3	63,5372	a
24 5,0	3	48,3634	b
12 9,0	3	46,8893	b
12 7,0	3	37,3215	c
12 5,0	3	24,5773	d
24 Kontrol	3	14,7431	e
12 Kontrol	3	11,5650	f

❖ Means that do not share a letter are significantly different.



**Lampiran 14.** Analisa Sidik Ragam Pengaruh Lama Hidrolisis dan pH terhadap Derajat Hidrolisis Hidrolisat Protein Ikan Sapu-Sapu

**Analysis of Variance**

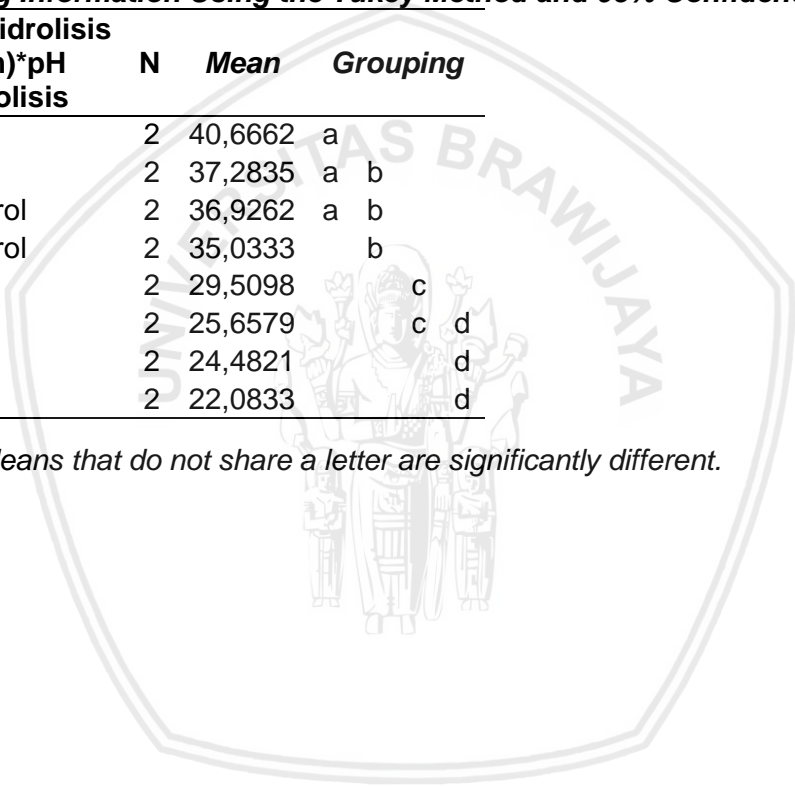
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Lama Hidrolisis (Jam)	1	216,462	216,462	182,87	0,000
pH Hidrolisis	3	366,090	122,030	103,09	0,000
Lama Hidrolisis (Jam)*pH Hidrolisis	3	88,240	29,413	24,85	0,000
Error	8	9,470	1,184		
Total	15	680,262			

❖ P-Value < 0,05 (P < 0,05) = berbeda nyata, maka uji lanjut Tukey

**Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence**

Lama Hidrolisis (Jam)*pH Hidrolisis	N	Mean	Grouping
24 9,0	2	40,6662	a
24 7,0	2	37,2835	a b
24 Kontrol	2	36,9262	a b
12 Kontrol	2	35,0333	b
12 9,0	2	29,5098	c
24 5,0	2	25,6579	c d
12 7,0	2	24,4821	d
12 5,0	2	22,0833	d

❖ Means that do not share a letter are significantly different.



**Lampiran 15.** Analisa Sidik Ragam Pengaruh Lama Hidrolisis dan pH terhadap Kadar protein Hidrolisat Protein Ikan Sapu-Sapu

**Analysis of Variance**

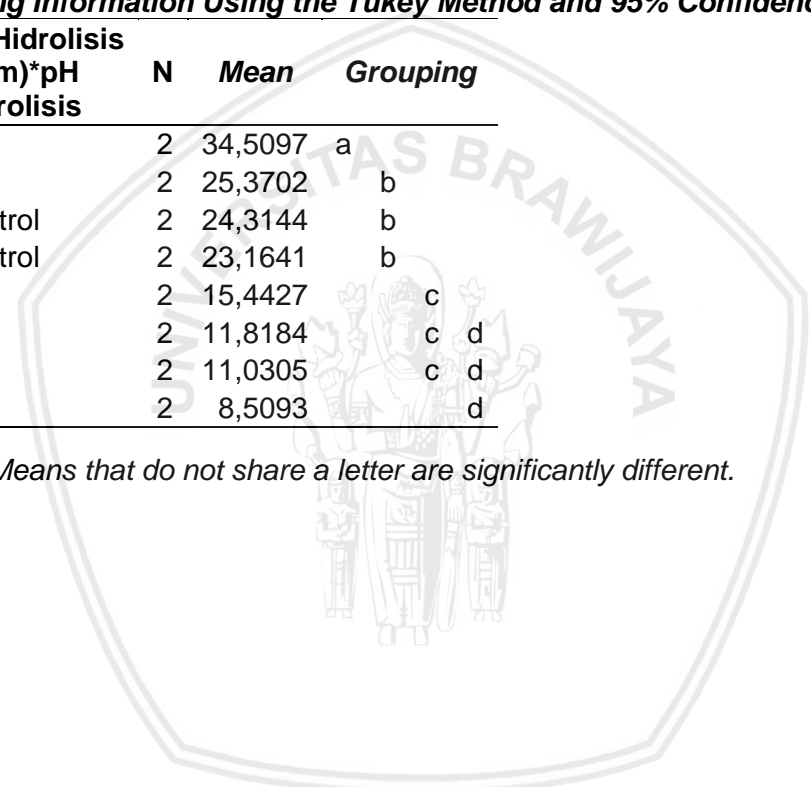
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Lama Hidrolisis (Jam)	1	329,25	329,248	206,46	0,000
pH Hidrolisis	3	572,98	190,992	119,77	0,000
Lama Hidrolisis (Jam)*pH Hidrolisis	3	225,63	75,211	47,16	0,000
Error	8	12,76	1,595		
Total	15	1140,62			

❖ P-Value pH < 0,05 (P<0,05) = berbeda nyata, maka uji lanjut Tukey

**Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence**

Lama Hidrolisis (Jam)*pH Hidrolisis	N	Mean	Grouping
24 9,0	2	34,5097	a
24 7,0	2	25,3702	b
24 Kontrol	2	24,3144	b
12 Kontrol	2	23,1641	b
12 9,0	2	15,4427	c
12 7,0	2	11,8184	c d
24 5,0	2	11,0305	c d
12 5,0	2	8,5093	d

❖ Means that do not share a letter are significantly different.



**Lampiran 16.** Analisa Sidik Ragam Pengaruh Lama Hidrolisis dan pH terhadap Kadar Air Hidrolisat Protein Ikan Sapu-Sapu

**Analysis of Variance**

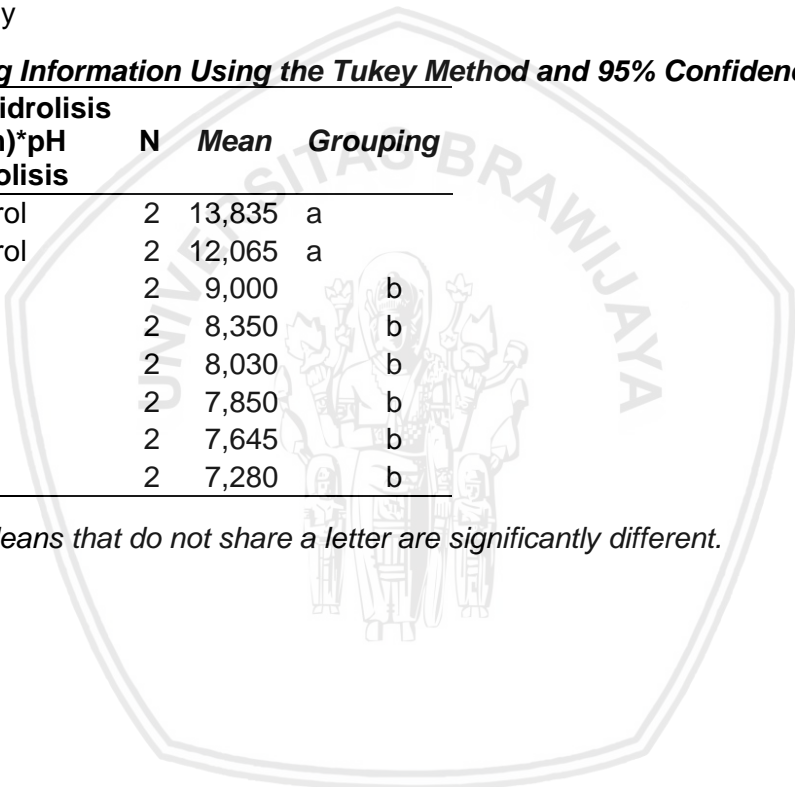
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Lama Hidrolisis (Jam)	1	4,7852	4,7852	10,32	0,012
pH Hidrolisis	3	73,9329	24,6443	53,13	0,000
Lama Hidrolisis (Jam)*pH Hidrolisis	3	0,7298	0,2433	0,52	0,678
Error	8	3,7105	0,4638		
Total	15	83,1583			

- ❖ P-Value Lama Hidrolisis\*pH > 0,05 (P>0,05) = tidak berbeda nyata
- ❖ P-Value Lama Hidrolisis & pH < 0,05 (P<0,05) = berbeda nyata, maka uji lanjut Tukey

**Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence**

Lama Hidrolisis (Jam)*pH Hidrolisis	N	Mean	Grouping
12 Kontrol	2	13,835	a
24 Kontrol	2	12,065	a
12 5,0	2	9,000	b
12 7,0	2	8,350	b
12 9,0	2	8,030	b
24 5,0	2	7,850	b
24 7,0	2	7,645	b
24 9,0	2	7,280	b

- ❖ Means that do not share a letter are significantly different.



**Lampiran 17.** Analisa Sidik Ragam Pengaruh Lama Hidrolisis dan pH terhadap Kadar Abu Hidrolisat Protein Ikan Sapu-Sapu

**Analysis of Variance**

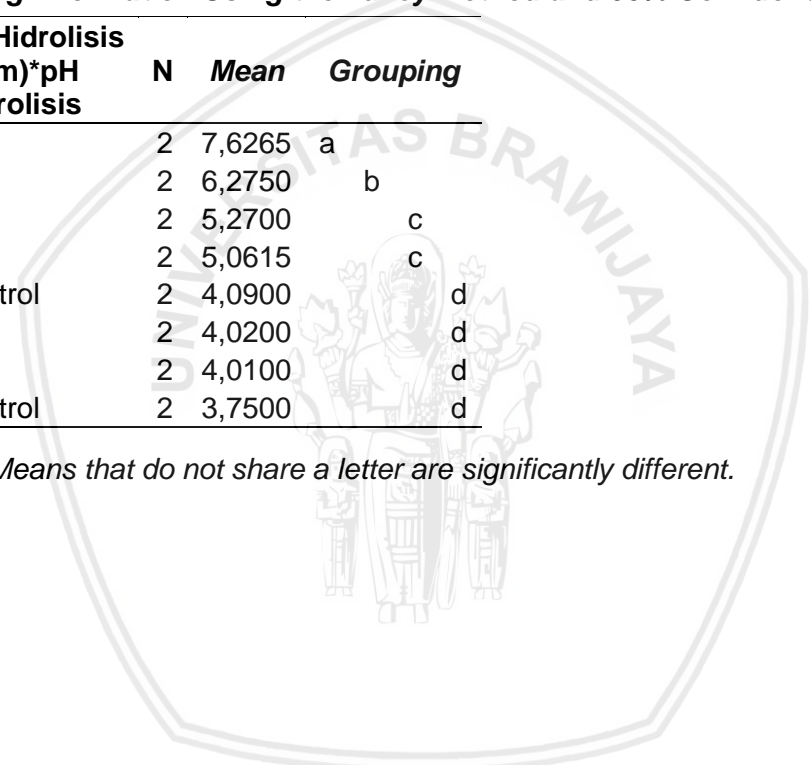
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Lama Hidrolisis (Jam)	1	0,9120	0,91202	39,00	0,000
pH Hidrolisis	3	23,8754	7,95848	340,33	0,000
Lama Hidrolisis (Jam)*pH Hidrolisis	3	1,0737	0,35790	15,30	0,001
Error	8	0,1871	0,02338		
Total	15	26,0482			

❖ P-Value < 0,05 (P<0,05) = berbeda nyata, maka uji lanjut Tukey

**Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence**

Lama Hidrolisis (Jam)*pH Hidrolisis	N	Mean	Grouping
24 9,0	2	7,6265	a
12 9,0	2	6,2750	b
24 5,0	2	5,2700	c
12 5,0	2	5,0615	c
24 Kontrol	2	4,0900	d
24 7,0	2	4,0200	d
12 7,0	2	4,0100	d
12 Kontrol	2	3,7500	d

❖ Means that do not share a letter are significantly different.



**Lampiran 18.** Analisa Sidik Ragam Pengaruh Lama Hidrolisis dan pH terhadap Kadar Lemak Hidrolisat Protein Ikan Sapu-Sapu

**Analysis of Variance**

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Lama Hidrolisis (Jam)	1	0,03432	0,03432	0,92	0,365
pH Hidrolisis	3	1,94318	0,64773	17,39	0,001
Lama Hidrolisis (Jam)*pH Hidrolisis	3	0,04034	0,01345	0,36	0,783
Error	8	0,29804	0,03726		
Total	15	2,31588			

- ❖ P-Value Lama Hidrolisis & Lama Hidrolisis\*pH > 0,05 (P>0,05) = tidak berbeda nyata
- ❖ P-Value pH < 0,05 (P<0,05) = berbeda nyata, maka uji lanjut Tukey

**Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence**

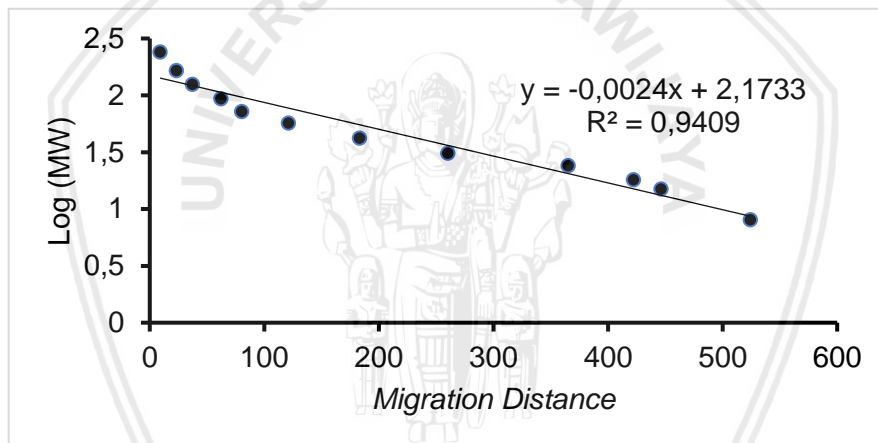
Lama Hidrolisis (Jam)*pH Hidrolisis			
	N	Mean	Grouping
12 Kontrol	2	5,3500	a
24 7,0	2	5,3050	a
24 Kontrol	2	5,2770	a
12 7,0	2	5,1250	a b
24 9,0	2	5,1000	a b
12 9,0	2	4,9350	a b
24 5,0	2	4,4650	b
12 5,0	2	4,3665	b

- ❖ Means that do not share a letter are significantly different.

Lampiran 19. Kurva Standar Marker Protein SDS-PAGE

a) Contoh pada Perlakuan 12 Jam pH 5

Standart Band	Migration Distance Standart	MW (Da) Standart	Log (MW) Standart	Slope	Intercept
1	9	240	2,380211242		
2	23	165	2,217483944		
3	37	125	2,096910013		
4	62	93	1,968482949		
5	80	72	1,857332496		
6	121	57	1,755874856	-0,0024	2,1733
7	183	42	1,62324929		
8	260	31	1,491361694		
9	365	24	1,380211242		
10	422	18	1,255272505		
11	446	15	1,176091259		
12	524	8	0,903089987		



Slope	Intercept	Distance Sample pH 5 & 12 h	Log (MW) Sample	MW (KDa) Sample
-0,0024	2,1733	43	2,0701	117,52
		70	2,0053	101,23
		102	1,9285	84,82
		119	1,8877	77,21
		146	1,8229	66,51
		170	1,7653	58,25
		199	1,6957	49,62
		219	1,6477	44,43
		264	1,5397	34,65
		345	1,3453	22,15
		480	1,0213	10,50
		537	0,8845	7,66
		577	0,7885	6,14

- Perhitungan Log (MW) Sample

$$\begin{aligned}
 y &= -0,0024x + 2,1733 \\
 &= -0,0024(43) + 2,1733 \\
 &= 2,0701
 \end{aligned}$$

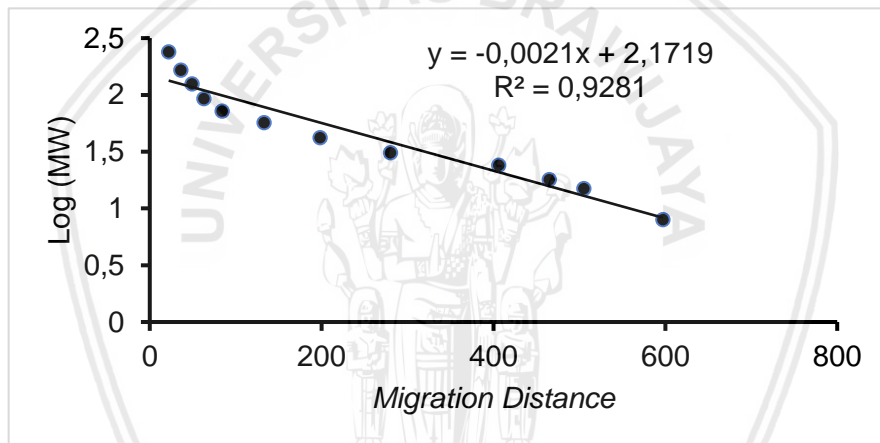
- Perhitungan MW (KDa) Sample

$$\begin{aligned}
 \text{KDa} &= 10^{(\log \text{MW})} \\
 &= 10^{2,0701} \\
 &= 103,82 \text{ KDa}
 \end{aligned}$$



b) Contoh pada Perlakuan 24 Jam pH 5

Standart Band	Migration Distance Standart	MW (Da) Standart	Log (MW) Standart	Slope	Intercept
1	22	240	2,380211242		
2	36	165	2,217483944		
3	49	125	2,096910013		
4	63	93	1,968482949		
5	84	72	1,857332496		
6	133	57	1,755874856		
7	198	42	1,62324929	-0,0021	2,1719
8	280	31	1,491361694		
9	406	24	1,380211242		
10	465	18	1,255272505		
11	505	15	1,176091259		
12	597	8	0,903089987		



Slope	Intercept	Distance Sample pH 5 & 24 h	Log (MW) Sample	MW (KDa) Sample
-0,0021	2,1719	39	2,09	123,03
		63	2,0396	109,55
		97	1,9682	92,94
		128	1,9031	80,00
		177	1,8002	63,12
		211	1,7288	53,55
		227	1,6952	49,57
		273	1,5986	39,68
		354	1,4285	26,82
		503	1,1156	13,05
		570	0,9749	9,44

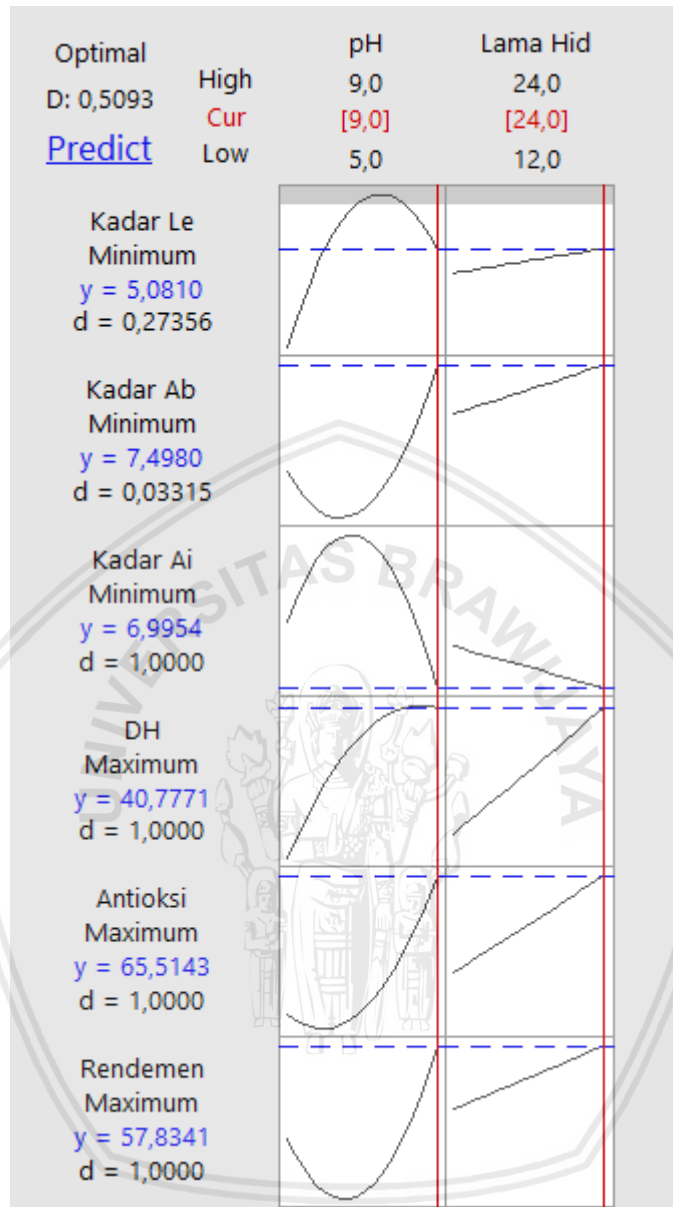
- Perhitungan Log (MW) Sample

$$\begin{aligned}
 y &= -0,0021x + 2,1719 \\
 &= -0,0021(39) + 2,1719 \\
 &= 2,09
 \end{aligned}$$

- Perhitungan MW (KDa) Sample

$$\begin{aligned}
 \text{KDa} &= 10^{(\log \text{MW})} \\
 &= 10^{2,09} \\
 &= 123,03 \text{ KDa}
 \end{aligned}$$

Lampiran 20. Grafik Nilai Optimasi HPI Sapu-Sapu



Lampiran 21. Hasil Pengujian Karakteristik HPI Sapu-Sapu dengan Perlakuan pH dan Lama Hidrolisis yang Berbeda serta Standar HPI

pH	Lama Hidrolisis	Parameter							Berat Molekul
		Rendemen (%)	Antioksidan (%)	DH (%)	Kadar Protein (%)	Kadar Air (%)	Kadar Abu (%)	Kadar Lemak (%)	
5	12	42,44±0,64	24,58±0,88	22,08±1,77	8,51±1,34	9,00±1,03	5,06±0,09	4,37±0,22	123,03 KDa; 109,55 KDa; 92,94 KDa; 80,00 KDa; 63,12 KDa; 53,55 KDa; 49,57 KDa; 39,68 KDa; 26,82 KDa; 13,03 KDa; dan 9,44 KDa
	24	50,15±1,28	48,36±1,42	25,66±0,93	11,03±1,34	7,85±0,55	5,27±0,06	4,46±0,06	117,53 KDa; 101,23 KDa; 84,82 KDa; 77,21 KDa; 66,51 KDa; 58,25 KDa; 49,62 KDa; 44,43 KDa; 34,65 KDa; 22,15 KDa; 10,50 KDa; 7,66 KDa dan 6,14 KDa
7	12	45,95±0,28	37,32±1,03	24,48±1,74	11,82±1,11	8,35±0,81	4,01±0,01	5,12±0,01	122,23 KDa; 104,88 KDa; 87,28 KDa; 72,98 KDa; 65,61 KDa; 51,03 KDa; 48,38 KDa; 43,29 KDa; 29,40 KDa; 12,37 KDa; dan 10,65 KDa
	24	50,77±1,10	63,54±0,38	37,28±0,54	25,39±1,56	7,65±0,30	4,02±0,01	5,30±0,13	118,17 KDa; 100,67 KDa; 87,20 KDa; 74,70 KDa; 66,15 KDa; 57,61 KDa; 49,35 KDa; 44,19 KDa; 33,15 KDa; 21,90 KDa; 10,62 KDa; 8,01 KDa dan 6,53 KDa
9	12	47,21±1,08	46,89±1,12	29,51±0,69	15,44±0,89	8,03±0,54	6,28±0,06	4,94±0,09	122,43 KDa; 100,42 KDa; 90,72 KDa; 80,78 KDa; 60,44 KDa; 51,52 KDa; 47,46 KDa; 37,81 KDa; 24,95 KDa; 8,74 KDa; dan 7,23 KDa
	24	57,39±0,17	63,99±0,62	40,67±1,19	34,51±1,56	7,28±1,06	7,65±0,19	5,10±0,14	116,87 KDa; 100,12 KDa; 84,35 KDa; 72,66 KDa; 65,42 KDa; 56,98 KDa; 48,54 KDa; 44,19 KDa; 33,52 KDa; 22,77 KDa; 10,86 KDa; 8,33 KDa; dan 7,02 KDa
Kontrol (pH 6,4)	12	20,29±0,27	11,56±1,59	35,03±0,14	23,16±0,22	13,84±0,36	3,75±0,33	5,35±0,21	-
	24	25,22±0,69	14,74±0,94	36,93±0,48	24,31±1,49	12,07±0,23	4,09±0,17	5,28±0,39	-
Standar HPI Komersil (%bb) (International Quality Ingredients, 2005)		-	-	-	73,00-75,00	3,00-5,00	4,00-7,00	19,00-22,00	-
Standar HPI Komersil (%bk) (International Quality Ingredients, 2005)		-	-	-	75,26-78,95	-	4,12-7,37	19,59-23,16	-

