

KARAKTERISTIK HIDROLISAT PROTEIN DARI KEPALA IKAN KAKATUA
(Chlorurus sordidus) MENGGUNAKAN pH DAN LAMA HIDROLISIS YANG
BERBEDA

SKRIPSI

Oleh:

ANNAS DWI BAGUS INDRA SYAIFUDIN
NIM. 155080300111002



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

KARAKTERISTIK HIDROLISAT PROTEIN DARI KEPALA IKAN KAKATUA
(Chlorurus sordidus) MENGGUNAKAN pH DAN LAMA HIDROLISIS YANG
BERBEDA

SKRIPSI

PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERIKANAN

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

Oleh:
ANNAS DWI BAGUS INDRA SYAIFUDIN
NIM. 155080300111002



FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019

SKRIPSI

KARAKTERISTIK HIDROLISAT PROTEIN DARI KEPALA IKAN KAKATUA
(Chlorurus sordidus) MENGGUNAKAN pH DAN LAMA HIDROLISIS YANG
BERBEDA

Oleh:
ANNAS DWI BAGUS INDRA SYAIFUDIN
NIM. 155080300111002

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

Menyetujui,
Dosen Pembimbing I



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

Menyetujui,
Dosen Pembimbing II



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

Tanggal: 12 JUL 2019

Tanggal: 12 JUL 2019

Mengetahui,
Ketua Jurusan



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

Tanggal: 12 JUL 2019

IDENTITAS TIM PENGUJI

JUDUL : KARAKTERISTIK HIDROLISAT PROTEIN DARI KEPALA IKAN KAKATUA (*Chlorurus sordidus*) MENGGUNAKAN pH DAN LAMA HIDROLISIS YANG BERBEDA

Nama Mahasiswa : Annas Dwi Bagus Indra Syaifudin

NIM : 155080300111002

Program Studi : Teknologi Hasil Perikanan

PENGUJI PEMBIMBING

Pembimbing 1 : Rahmi Nurdiani., S.Pi.,M.App.Sc.,Ph.D

Pembimbing 2 : Dr. Sc. Asep Awaludin Prihanto, S.Pi., MP

PENGUJI BUKAN PEMBIMBING

Dosen Penguji 1 : Dr. Ir. Anies Chamidah, MP

Dosen Penguji 2 : Ir. Sri Dayuti, MP

Tanggal Ujian : 24 Juni 2019

PERNYATAAN ORISINALITAS SKRIPSI

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 jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.



UCAPAN TERIMAKASIH

Pada kesempatan ini, penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Allah SWT atas karunia dan kesehatan yang diberikan selama ini sehingga laporan praktik kerja magang ini dapat terselesaikan dengan baik.
2. Bapak Dr. Ir. Muhamad Firdaus, MP. selaku Ketua Jurusan Manajemen Sumberdaya Perairan.
3. 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, dan motivasi kepada penulis untuk terus belajar dan belajar, disamping masukan-masukan yang diberikan untuk penulis.
4. Lina, Oca, Ojan, Erda, Gofur, Oza, Nurul dan Dewi selaku teman-teman tim bimbingan yang saling mendukung satu sama lain serta keluarga besar Teknologi Hasil Perikanan 2015.
5. Kepada teman dekat saya yaitu Baltazar, Prissilia, Mbak Ken, Mbak Hidayatun dan geng kimpang jaya (Proyus, Tiwi, Rika, Cili, CL, Bena, ChaMun dan Mamud Dysa) yang selalu memberi semangat saya dalam menyelesaikan kuliah.
6. Terimakasih kepada Bioseafood yang telah mendukung dan memberi bantuan terhadap penelitian penulis.

Malang, Juni 2019

Annas Dwi Bagus Indra Syaifudin

RINGKASAN

ANNAS DWI BAGUS INDRA SYAIFUDIN. Karakteristik Hidrolisat Protein dari Kepala Ikan Kakatua (*Chlorurus sordidus*) Menggunakan pH dan Lama Hidrolisis yang Berbeda Di bawah bimbingan **Rahmi Nurdiani, S.Pi., M.App.Sc,PhD** dan **Dr. Sc. Asep Awaludin Prihanto, S.Pi., MP**

Ikan kakatua (*Chlorurus sordidus*) merupakan salah satu ikan komoditi ekonomis penting yang dieksport dalam keadaan segar maupun beku ke berbagai negara di Asia seperti Hongkong, Taiwan dan Singapura. Hal tersebut berdampak pada peningkatan limbah yang dihasilkan. Secara umum, limbah ikan mengandung banyak unsur seperti Nitrogen, Fosfor, Kalium dan lainnya yang menjadi fraksi penyusun protein dan lemak. Berdasarkan kandungan tersebut, limbah ikan berpotensi untuk dikembangkan menjadi produk hidrolisat protein ikan. Hidrolisat protein ikan (HPI) merupakan produk yang dihasilkan dari proses penguraian protein ikan menjadi peptida sederhana melalui proses hidrolisis dengan penambahan enzim, asam atau basa. Hidrolisat protein ikan seringkali dimanfaatkan sebagai bahan dasar bahan tambahan pangan dan suplemen makanan dengan tujuan untuk meningkatkan serta memenuhi asupan protein. Hidrolisis menggunakan enzim komersil dapat dilakukan namun dengan harga yang relatif lebih mahal sehingga diperlukan adanya solusi yaitu memanfaatkan enzim endogen yang bisa didapatkan dengan mudah dari limbah hasil perikanan. Pemilihan kondisi hidrolisis seperti penerapan pH, suhu dan lama hidrolisis perlu dilakukan untuk menghasilkan produk hidrolisat protein yang optimal.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui karakteristik hidrolisat protein dari kepala ikan kakatua (*Chlorurus sordidus*) menggunakan pH dan lama hidrolisis yang berbeda dan hasil perlakuan terbaik dari proses pembuatan hidrolisat protein dari kepala ikan kakatua (*Chlorurus sordidus*). Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari – Maret 2019 di Laboratorium Perekayasaan Hasil Perikanan, Laboratorium Nutrisi Ikan, Laboratorium Keamanan Hasil Perikanan dan Laboratorium Hidrobiologi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan.

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimen. Parameter uji pada penelitian ini meliputi uji rendemen, uji aktivitas antioksidan, kadar air, kadar abu, kadar lemak, kadar protein, derajat hidrolisis dan berat molekul. Rancangan percobaan dalam penelitian utama adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial dengan menggunakan 8 perlakuan dan 3 kali ulangan. Kemudian untuk data hasil penelitian dianalisa dengan *Analysis of Variance (ANOVA)* menggunakan software Minitab versi 18 untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap respon parameter yang dilakukan dengan uji F pada taraf 5%. Kriteria penerimaan dan penolakan hipotesis statistik dapat dilihat dari nilai p (probabilitas) jika didapatkan hasil yang berbeda nyata ($p < 0,05$) maka dilakukan uji lanjut Tukey. Analisa penentuan perlakuan terbaik menggunakan *Response Surface Methodology (RSM)*.

Hasil penelitian menunjukkan perlakuan variasi pH dan lama hidrolisis yang berbeda memberikan pengaruh terhadap karakteristik HPI kecuali pada kadar air dan kadar lemak dengan hasil terbaik pada perlakuan pH 9 dengan lama hidrolisis 24 jam. Karakteristik pada perlakuan terbaik meliputi rendemen 49%, aktivitas antioksidan 58,2%, kadar air 7,85%, kadar abu 8%, kadar lemak 0,68%, kadar protein 38,59%, DH 30,65%, serta berat molekulnya 17,55 kDa sampai 85,72 kDa dengan kandungan total asam amino esensial sebesar 41,69% dan total asam amino hidrofobik sebesar 41%.

KATA PENGANTAR

Dengan mengucap puji syukur ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa atas segala anugerah dan karuniaNya, sehingga penulis dapat menyajikan Skripsi yang berjudul "**Karakteristik Hidrolisat Protein dari Kepala Ikan Kakatua (*Chlorurus sordidus*) Menggunakan pH dan Lama Hidrolisis yang Berbeda**". Penulis menyusunnya sebagai syarat dalam meraih gelar Sarjana Perikanan, di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang.

Penulis menyadari bahwa tugas akhir ini belum sempurna, baik dari segi materi ataupun penyajiannya. Untuk itu saran dan kritik yang membangun sangat diharapkan dalam penyempurnaan tugas akhir ini.

Terakhir penulis berharap, semoga tugas akhir ini dapat memberikan hal yang bermanfaat dan menambah wawasan bagi pembaca dan khususnya bagi penulis juga.

Malang, Juni 2019

Penulis

DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN.....	iii
IDENTITAS TIM PENGUJI.....	vi
PERNYATAAN ORISINALITAS SKRIPSI.....	vii
UCAPAN TERIMAKASIH.....	viii
RINGKASAN.....	ix
KATA PENGANTAR	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
1. PENDAHULUAN	1
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.....	4
2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Ikan Kakatua (<i>Chlorurus sordidus</i>)	5
2.1.1 Klasifikasi Ikan Kakatua (<i>Chlorurus sordidus</i>)	5
2.1.2 Morfologi Ikan Kakatua (<i>Chlorurus sordidus</i>)	6
2.1.3 Penangkapan Ikan Kakatua (<i>Chlorurus sordidus</i>)	7
2.2 Limbah Hasil Perikanan	7
2.3 Hidrolisat Protein Ikan (HPI).....	9
2.3.1 Definisi Hidrolisat Protein Ikan (HPI)	9
2.3.2 Hidrolisis Enzimatis	10
2.3.3 Sifat Fisika dan Kimia Hidrolisat Protein Ikan (HPI)	11
2.3.4 Metode Pembuatan Hidrolisat Protein Ikan (HPI)	14
2.3.5 Manfaat Hidrolisat Protein Ikan (HPI)	15
2.4 pH Hidrolisis	17
2.5 Lama Hidrolisis	18
3. METODE PENELITIAN.....	19
3.1 Alat dan Bahan	19
3.1.1 Alat	19
3.1.2 Bahan	19
3.2 Metode Penelitian.....	20
3.2.1 Metode.....	20
3.2.2 Variabel Penelitian	20
3.3 Rancangan Penelitian	21
3.3.1 Rancangan Penelitian Pendahuluan	21
3.3.2 Rancangan Penelitian Utama	22
3.4 Prosedur Penelitian	24
3.4.1 Preparasi Sampel.....	25
3.4.2 Penelitian Pendahuluan	26
3.4.2 Penelitian Utama.....	28
3.5 Analisa Karakteristik Hidrolisat Protein Ikan	30
3.5.1 Rendemen	30

3.5.2	Aktivitas Antioksidan	30
3.5.3	Kadar Protein	31
3.5.4	Derajat Hidrolisis (DH)	31
3.5.5	Berat Molekul (SDS PAGE)	32
3.5.6	Kadar Air	33
3.5.7	Kadar Abu	34
3.5.8	Kadar Lemak	34
3.5.9	Penentuan Perlakuan Terbaik	35
3.5.10	Asam Amino	36
4.	HASIL DAN PEMBAHASAN	38
4.1	Penelitian Pendahuluan	38
4.2	Hidrolisat Protein Kepala Ikan Kakatua	41
4.3	Penelitian Utama	43
4.3.1	Rendemen	43
4.3.2	Aktivitas Antioksidan	46
4.3.3	Kadar Protein	48
4.3.4	Derajat Hidrolisis (DH)	50
4.3.5	Berat Molekul	51
4.3.6	Kadar Air	54
4.3.7	Kadar Abu	56
4.3.8	Kadar Lemak	57
4.4	Perlakuan Terbaik Hidrolisat Protein Kepala Ikan Kakatua	59
4.5	Komposisi Asam Amino Hidrolisat Protein Kepala Ikan Kakatua	61
5.	KESIMPULAN DAN SARAN	64
5.1	Kesimpulan	64
5.2	Saran	64
DAFTAR PUSTAKA		65
LAMPIRAN		75

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Komposisi Kimia Kepala Ikan Kakatua.....	9
2. Komposisi Kimia Hidrolisat Protein Ikan.....	12
3. Komposisi Asam Amino Hidrolisat Protein Komersil	13
4. Kombinasi Perlakuan dan Ulangan pada Penelitian Pendahuluan	21
5. Kombinasi Perlakuan antara pH dan Lama Hidrolisis.....	23
6. Nilai Pengukuran Berat Molekul HPI Kepala Ikan Kakatua	52
7. Hasil Perlakuan Terbaik Hidrolisat Protein Kepala Ikan Kakatua	61
8. Komposisi Asam Amino Hidrolisat Protein Kepala Ikan Kakatua	62



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Ikan Kakatua (<i>Chlorurus sordidus</i>).....	6
2. Pengembangan Pemanfaatan Hidrolisat Protein	16
3. Prinsip Pembuatan Hidrolisat Protein Ikan (HPI)	15
4. Sampel Limbah Kepala Ikan Kakatua (<i>Chlorurus sordidus</i>)	25
5. Diagram Alir Penelitian Pendahuluan.....	28
6. Pembuatan Hidrolisat Protein Kepala Ikan Kakatua	29
7. Rendemen dan Aktivitas Antioksidan Penelitian Pendahuluan	39
8. Hasil Pemisahan Menggunakan Sentrifuge	41
9. HPI Kepala Ikan Kakatua.....	42
10. Rendemen HPI Kepala Ikan Kakatua.....	44
11. Aktivitas Antioksidan HPI Kepala Ikan Kakatua	46
12. Kadar Protein HPI Kepala Ikan Kakatua	48
13. Derajat Hidrolisis HPI Kepala Ikan Kakatua	50
14. Profil Distribusi Berat Molekul HPI Kepala Ikan Kakatua	52
15. Kadar Air Serbuk HPI Kepala Ikan Kakatua.....	54
16. Kadar Abu Serbuk HPI Kepala Ikan Kakatua.....	56
17. Kadar Lemak Serbuk HPI Kepala Ikan Kakatua	58
18. Overlaid Contour Plot Karakteristik HPI Kepala Ikan Kakatua	60

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Proses Pembuatan Hidrolisat Protein Kepala Ikan Kakatua.....	75
2. Diagram Alir Pengujian Aktivitas Antioksidan.....	77
3. Diagram Alir Pengujian Protein.....	78
4. Diagram Alir Pengujian Derajat Hidrolisis (DH).....	79
5. Diagram Alir Pengujian Berat Molekul (SDS PAGE)	80
6. Diagram Alir Pengujian Kadar Air	81
7. Diagram Alir Pengujian kadar Abu	82
8. Diagram Alir Pengujian Kadar Lemak	83
9. Diagram Alir Pengujian Komposisi Asam Amino	84
10. Perhitungan Pembuatan Larutan HCl 6N dan NaOH 6N	85
11. Perhitungan Pembuatan Larutan DPPH 0.075 mM	86
12. Perhitungan Pembuatan Larutan H_2SO_4 0.1N	87
13. Perhitungan Pembuatan Larutan 0.5 M Tris-HCl (pH 6,8) dan 1.5 M .Tris-HCl (pH 8,8).....	88
14. Analisis keragaman pengaruh pH dan lama hidrolisis terhadap nilai Rendemen.....	89
15. Analisis keragaman pengaruh pH dan lama hidrolisis terhadap nilai Aktivitas Antioksidan	90
16. Analisis keragaman pengaruh pH dan lama hidrolisis terhadap nilai Kadar Protein	91
17. Analisis keragaman pengaruh pH dan lama hidrolisis terhadap nilai Derajat Hidrolisis	92
18. Data jarak <i>band</i> SDS dan kurva standar.....	93
19. Analisis keragaman pengaruh pH dan lama hidrolisis terhadap nilai Kadar Air	95
20. Analisis keragaman pengaruh pH dan lama hidrolisis terhadap nilai Kadar Abu	96
21. Analisis keragaman pengaruh pH dan lama hidrolisis terhadap nilai Kadar Lemak.....	97
22. Nilai optimasi HPI kepala ikan kakatua	98
23. Hasil pengujian karakteristik HPI kepala ikan kakatua	99

1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Ikan kakatua (*Chlorurus sordidus*) merupakan salah satu ikan komoditi ekonomis penting yang memiliki karakteristik serat daging yang halus dan lunak. Ikan kakatua dieksport dalam keadaan segar maupun beku ke berbagai negara di Asia seperti Hongkong, Taiwan dan Singapura (Adrim, 2010). Hal tersebut membuat usaha penangkapan ikan kakatua semakin meningkat setiap tahunnya sehingga secara tidak langsung berdampak pada peningkatan limbah yang dihasilkan (Melianawati dan Retno, 2009).

Limbah buangan ikan atau sering disebut dengan limbah hasil perikanan, didefinisikan sebagai sisa bahan (padatan, cairan, atau gas) yang telah melewati tahap penanganan dan pemrosesan, termasuk kepala, jeroan, tulang, kulit, sirip, telur dan lainnya yang dipanen atau ditangkap (Rustad *et al.*, 2011). Komposisi kepala ikan sendiri memiliki persentase kurang lebih 19% dari keseluruhan bagian ikan (Efendi *et al.*, 2016). Limbah hasil perikanan bila tidak dikelola dan diolah dengan baik akan menimbulkan ketidaknyamanan bagi manusia bahkan dapat mencemari dan merusak lingkungan (Indriani *et al.*, 2013). Saat ini, limbah ikan telah banyak dikembangkan menjadi pupuk, silase, pakan hewan peliharaan dan tepung ikan namun masih memiliki nilai ekonomis yang rendah (Sanmartin *et al.*, 2009).

Limbah ikan yang ada, dapat dikembangkan lebih lanjut menjadi suatu produk bernilai ekonomis tinggi bila ditangani dengan baik dan benar (Hapsari dan Welasi, 2013). Secara umum, limbah ikan mengandung banyak unsur seperti Nitrogen, Fosfor, Kalium dan lainnya yang menjadi fraksi penyusun protein dan lemak (Lepongbulan *et al.*, 2017). Berdasarkan kandungan tersebut, limbah ikan berpotensi untuk dikembangkan menjadi produk hidrolisat protein ikan. Hidrolisat

protein ikan seringkali dimanfaatkan sebagai bahan dasar bahan tambahan pangan dan suplemen makanan dengan tujuan untuk meningkatkan serta memenuhi asupan protein (Utomo *et al.*, 2014).

Hidrolisat protein ikan (HPI) merupakan produk yang dihasilkan dari proses penguraian protein ikan menjadi peptida sederhana melalui proses hidrolisis dengan penambahan enzim, asam atau basa (Nurilmala *et al.*, 2018). Pembuatan HPI yang dilakukan secara enzimatis mampu memecah protein ikan menjadi peptida yang lebih kecil dengan mengandung 2-20 asam amino (Chalamiah *et al.*, 2012). Penambahan enzim secara komersil dalam pembuatan HPI seperti papain, bromelin, protamex, alcalase dan lainnya memiliki suatu kelemahan yaitu harganya yang relatif mahal sehingga diperlukan adanya solusi yaitu memanfaatkan enzim endogen yang bisa didapatkan dengan mudah dari limbah hasil perikanan (saluran pencernaan, hati, otak dan lainnya) (Souissi *et al.*, 2007). Pembuatan hidrolisat protein dari limbah kepala ikan cod (Meldstad, 2007), ikan *alaska pollack* (Je *et al.*, 2005), ikan baramudi, ikan *silver warehou* dan ikan salmon (Nurdiani *et al.*, 2015) yang dihidrolisis menggunakan protease endogen selama semalam memberikan hasil karakteristik HPI yang bervariasi tergantung pada kondisi hidrolisisnya. Menurut Utomo *et al.* (2014), pemilihan kondisi hidrolisis seperti penerapan pH, suhu dan lama hidrolisis perlu dilakukan untuk menghasilkan produk hidrolisat protein yang optimal.

Pada penelitian sebelumnya, telah dilakukan pengembangan HPI dengan penggunaan berbagai bahan baku limbah hasil perikanan, diantaranya limbah kepala ikan cod (Himonides *et al.*, 2011), patin (Nurilmala *et al.*, 2018), tuna (Bougatef *et al.*, 2012), salmon (Jeevitha *et al.*, 2014) dan nila (Srikanya *et al.*, 2017). Pembuatan hidrolisat protein ikan dari limbah kepala ikan kakatua masih terbatas, sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut. Penelitian ini dilakukan dengan beberapa perlakuan terhadap pH dan lama hidrolisis yang berbeda,

sehingga dapat diketahui kondisi hidrolisis yang optimal pada protease endogen limbah kepala ikan kakatua.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian pada latar belakang, permasalahan yang akan diselesaikan dalam penelitian ini adalah apakah penggunaan pH dan lama hidrolisis yang berbeda pada pembuatan hidrolisat protein ikan memberikan pengaruh terhadap karakteristik hidrolisat protein dari kepala ikan kakatua (*Chlorurus sordidus*)?

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakteristik hidrolisat protein dari kepala ikan kakatua (*Chlorurus sordidus*) menggunakan pH dan lama hidrolisis yang berbeda dan mengetahui hasil perlakuan terbaik dari proses pembuatan hidrolisat protein dari kepala ikan kakatua (*Chlorurus sordidus*).

1.4 Hipotesis

Hipotesis yang dapat diambil dari penelitian adalah:

H_0 : Penggunaan pH dan lama hidrolisis yang berbeda pada pembuatan hidrolisat protein ikan tidak memberikan pengaruh terhadap karakteristik hidrolisat protein dari kepala ikan kakatua (*Chlorurus sordidus*).

H_1 : Penggunaan pH dan lama hidrolisis yang berbeda pada pembuatan hidrolisat protein ikan memberikan pengaruh terhadap karakteristik hidrolisat protein dari kepala ikan kakatua (*Chlorurus sordidus*).

1.5 Kegunaan

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang kondisi optimal dalam pembuatan hidrolisat protein dari kepala ikan kakatua (*Chlorurus*

sordidus) menggunakan pH dan lama hidrolisis yang berbeda sehingga dapat menghasilkan hidrolisat protein ikan dengan karakteristik yang baik.

1.6 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari – Maret 2019 di Laboratorium Perekayasaan Hasil Perikanan, Laboratorium Nutrisi Ikan, Laboratorium Keamanan Hasil Perikanan, Laboratorium Hidrobiologi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya, Malang dan laboratorium Saraswanti Indo Genetech, Bogor.



2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Ikan Kakatua (*Chlorurus sordidus*)

Ikan kakatua (*Chlorurus sordidus*) tergolong hewan penghuni perairan karang dan termasuk ke dalam famili Scaridae. Ikan ini merupakan salah satu jenis ikan herbivor utama di ekosistem terumbu karang (Sale, 1991). Ikan kakatua memiliki ukuran tubuh yang beragam, mulai dari ukuran sedang sampai besar (Parenti dan Randall, 2000). Ikan kakatua juga bisa sebagai ikan pemakan alga di karang mati. Ciri khusus yang membedakan ikan kakatua dengan ikan lainnya yang paling mudah adalah dengan melihat komposisi warna, dikarenakan ikan kakatua memiliki variasi warna yang beraneka ragam pada tubuhnya (FAO, 2001).

2.1.1 Klasifikasi Ikan Kakatua (*Chlorurus sordidus*)

Adapun klasifikasi dari ikan kakatua (*Chlorurus sordidus*) menurut *World Wide Fund Indonesia* (2015), adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Phylum	: Chordata
Divisi	: Teleostei
Kelas	: Actinopterigii
Ordo	: Perciformes
Famili	: Scaridae
Genus	: <i>Chlorurus</i>
Spesies	: <i>Chlorurus sordidus</i>
Nama Internasional	: <i>Parrotfish</i>
Nama Lokal	: Ikan Kakatua (Betet)

Ikan kakatua (*Chlorurus sordidus*) yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Ikan Kakatua (*Chlorurus sordidus*)
(Sumber: Suprapto, 2018)

2.1.2 Morfologi Ikan Kakatua (*Chlorurus sordidus*)

Ikan kakatua (*Chlorurus sordidus*) mempunyai susunan gigi dan bentuk tubuh yang amat khusus. Gigi ikan kakatua tergolong sebagai gigi jenis plat karena semua giginya menyatu menjadi satu bagian pada masing-masing rahang, namun gigi di rahang atas sedikit lebih condong kedepan sehingga menyerupai paruh burung kakak tua (Masuda *et al.*, 1984). Ikan kakatua dewasa biasanya memiliki ukuran tubuh sekitar 20-40 cm. Untuk ukuran tubuh ikan kakatua yang sering tertangkap oleh nelayan lokal yaitu antara 10-40 cm (Rahaningmas dan Ali, 2018).

Ikan kakatua tubuhnya berbentuk pipih dan agak lonjong yang ditutupi oleh sisik besar yang tidak bergerigi (*cycloid*). Ikan kakak tua memiliki banyak duri di setiap siripnya. Sirip punggungnya terdiri atas 9 duri keras dan 10 duri lunak, sirip duburnya terdiri atas 3 duri keras dan 9 duri lunak, sirip dadanya terdiri atas 13-17 duri lemah sedangkan sirip perutnya terdiri atas 1 duri keras dan 5 duri lunak. Gurat sisi ikan kakatua memiliki 22-24 sisik berporos dan terpisah menjadi dua bagian (Adrim, 2010).

Tubuh *Chlorurus sordidus* pada umumnya mempunyai aneka ragam corak dan warna. Warna tubuh ikan ini dapat pula dipakai untuk membedakan antara satu jenis dengan jenis lainnya. Namun adakalanya terjadi kesulitan dalam menggunakan warna untuk identifikasi, yaitu ketika ikan ini masih dalam ukuran

tertentu yakni pada usia muda (ketika tengah mengalami fase kelamin betina). Pada saat berstatus sebagai ikan muda dengan jenis kelamin betina hampir semua jenis kakatua berwarna keabu-abuan atau kecoklatan, tetapi setelah semakin menginjak dewasa dan masuk fase pejantan yang merupakan fase akhir dari kehidupannya, warna tubuhnya berubah menjadi warna-warni yang sangat kontras (Choat, 1996).

2.1.3 Penangkapan Ikan Kakatua (*Chlorurus sordidus*)

Penangkapan ikan kakatua didasari oleh kelimpahannya disuatu ekosistem perairan. Pada umumnya, ikan kakatua hidup di perairan tropis dan subtropis. Di kawasan perairan Indonesia ikan kakatua tergolong ikan yang cukup melimpah yaitu sekitar 36 jenis (Beaufort, 1940). Sebagian besar nelayan lokal menangkap ikan kakatua menggunakan pancing ulur dan alat tangkap lainnya seperti bubu dan jaring insang dasar (Rahaningmas *et al.*, 2014).

Saat ini, ikan kakatua menjadi salah satu komoditas hasil tangkapan nelayan dengan nilai ekonomis yang penting (Lestari *et al.*, 2017). Jenis ikan ini sangat disukai oleh masyarakat di negara-negara Asia, seperti Hongkong, Taiwan dan Singapura karena memiliki serat daging yang halus dan lunak, sehingga permintaannya terus meningkat (Adrim, 2010). Namun karena serat dagingnya yang lebih halus dan lunak, ikan ini mudah mengalami proses pembusukan setelah ditangkap jika tidak diberi es atau garam (Alamsyah *et al.*, 2013). Berdasarkan data yang diperoleh pada tahun 2014, penangkapan ikan kakatua meningkat sebesar 18,8% (76 ton) dilihat dari data catatan perikanan resmi untuk seluruh area perikanan karang di wilayah Asia (FAO, 2015).

2.2 Limbah Hasil Perikanan

Setiap tahun diketahui banyak hasil tangkapan ikan laut yang digunakan sebagai bahan baku dalam industri makanan laut (*seafood*), dari hal tersebut

menghasilkan sekitar 100.000 ton produk sampingan ikan atau sering disebut dengan limbah ikan. Limbah ikan ini biasanya dibuang ataupun dijual sebagai produk yang dipandang sebelah mata. Padahal limbah ikan yang bernilai ekonomi rendah ini mengandung beberapa komponen protein dan asam amino esensial (Chamcheun, 2015). Limbah ikan sendiri dibagi menjadi beberapa jenis, diantaranya 1) limbah ikan dari hasil tangkapan non target; 2) limbah ikan dari sisa pengolahan meliputi jeroan, kepala, potongan, tulang, kulit, sirip dan bingkai; 3) limbah ikan akibat surplus penangkapan dan 5) limbah ikan selama pendistribusian (ikan busuk) (Irianto *et al.*, 2014).

Di beberapa negara berkembang, dampak yang diakibatkan oleh limbah industri perikanan menjadi masalah yang serius. Limbah hasil pengolahan ikan seperti organ internal, kulit, sisik, otot, kepala dan tulang yang diperoleh dari 70% bahan baku dapat berpotensi mencemari lingkungan jika tidak ditangani dengan baik (Cilbiz dan Hanol, 2015). Sebagian besar industri perikanan hanya memanfaatkan sekitar 40% dari ikan yaitu dagingnya saja, sedangkan sisanya 50%-60% dari total berat ikan adalah limbah hasil perikanan (Utomo *et al.*, 2014).

Kepala ikan merupakan salah satu limbah yang biasa didapat dari industri pengolahan daging ikan. Kepala ikan seringkali diolah menjadi tepung dan diaplikasikan pada produk pakan dengan tujuan meningkatkan kandungan nutrisi (Widiyanto *et al.*, 2018). Mayoritas kepala ikan mempunyai komponen utama yaitu berupa lemak, protein, garam kalsium, fosfat, dan selama ini belum dimanfaatkan secara optimal (Hadiwiyoto, 1993). Hasil komposisi kimia limbah kepala ikan kakatua (*Chlorurus sordidus*) segar dibandingkan dengan limbah kepala ikan salmon (*Oncorhynchus nerka*) (Wu *et al.*, 2011) dan limbah kepala ikan nila (*Oreochromis niloticus*) (Kefas *et al.*, 2014) disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi Kimia Kepala Ikan Kakatua Dibandingkan dengan Kepala Ikan Salmon dan Kepala Ikan Nila

Komposisi Kimia	Kepala Ikan Kakatua	Kepala Ikan Salmon *)	Kepala Ikan Nila **)
Karbohidrat (%)	0,52	-	37,78
Protein (%)	20,37	11,9	29,8
Lemak (%)	3,92	17,4	3,1
Air (%)	71,68	65,9	5,7
Abu (%)	4,19	4,3	21,8

Sumber: *) Wu *et al.*, 2011

**) Kefas *et al.*, 2014

2.3 Hidrolisat Protein Ikan (HPI)

Hidrolisat protein pertama kali diperkenalkan di Jepang dan Cina sekitar tahun 1990 dari hasil sampingan pembuatan Monosodium Glutamat (MSG). Hidrolisat protein dapat berbentuk cair, pasta, atau tepung yang bersifat higroskopis. Hidrolisat protein yang berbentuk cair mengandung 30 % padatan, sedangkan bentuk pasta mengandung 65 % padatan (Johnson dan Peterson, 1974). Hidrolisat protein merupakan produk yang dihasilkan dari penguraian protein menjadi peptida dan asam amino melalui proses hidrolisis oleh asam, basa, enzim, atau fermentasi (Pasupuleti dan Demain, 2010).

2.3.1 Definisi Hidrolisat Protein Ikan (HPI)

Hidrolisat Protein Ikan (HPI) merupakan produk yang dihasilkan dari penguraian protein ikan menjadi senyawa-senyawa berantai pendek karena adanya proses hidrolisis baik oleh enzim, asam maupun basa. Bahan baku dari hidrolisat protein ikan biasanya berasal dari limbah buangan ikan yang tidak terpakai dan memiliki kandungan protein yang masih terjaga (Bernadeta *et al.*, 2012). Hidrolisat protein ikan dapat diproduksi secara kimiawi dan enzimatis. Hidrolisis secara enzimatis lebih efisien, murah, menghasilkan hidrolisat protein

ikan tanpa kehilangan asam amino esensial, serta terhindar dari perubahan atau kerusakan produk yang bersifat nonhidrolitik (Jonson and Peterson, 1974).

Hidrolisat protein merupakan sumber protein alami yang dihidrolisis sehingga mendapatkan protein yang lebih sederhana dengan harapan ketika dimanfaatkan mudah diserap oleh mahluk hidup. Hidrolisis yang terjadi mampu memecah molekul protein menjadi beberapa gugus asam amino maupun peptida melalui pemutusan ikatan rantai peptida (Rehm dan Reed, 1995). Proses hidrolisat diawali dengan pengecilan ukuran, kemudian pada kondisi tertentu substrat dihancurkan sehingga diperoleh peptida maupun asam amino (Haslina, 2004). Kondisi yang perlu diperhatikan selama hidrolisis berlangsung adalah suhu, nilai pH, dan lama hidrolisis (Gesualdo dan Li-Chan, 1999). Bila hidrolisis berjalan sempurna maka akan dihasilkan hidrolisat yang terdiri dari campuran 18-20 macam asam amino (Kirk dan Othmer, 1953).

2.3.2 Hidrolisis Enzimatis

Hidrolisis merupakan suatu reaksi dimana molekul air (H_2O) terpecah dan terjadi pengikatan terhadap molekul lain pada tiap gugusnya. Proses hidrolisis pada pembuatan hidrolisat protein ikan 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).

Hidrolisis enzimatik pada pembuatan HPI dapat dilakukan dengan enzim endogen yang sebagian besar berasal dari saluran pencernaan dan kepala (hati dan otak) melalui proses autolisis, atau penambahan enzim eksogen untuk

mendorong proses hidrolisis. Enzim bisa didapatkan dari protease yang berasal dari mikroba, tumbuhan dan hewan telah digunakan dalam hidrolisis protein ikan, termasuk beberapa enzim komersial protamex, papain, alcalase, bromelain dan lainnya (Souissi *et al.*, 2007). Namun salah satu kelemahan hidrolisis enzimatik menggunakan enzim komersial adalah harga yang relatif tinggi. Penggunaan enzim endogen yang berasal dari saluran pencernaan ikan menjadi salah satu solusi dalam menghadapi masalah ini. Hasil protein bisa bervariasi dalam metode ini dan tergantung pada berbagai faktor. Para peneliti berusaha menemukan kondisi optimal dalam memproduksi hidrolisat protein ikan menggunakan enzim endogen (Meldstad, 2015).

2.3.3 Sifat Fisika dan Kimia Hidrolisat Protein Ikan (HPI)

Karakteristik yang dimiliki oleh hidrolisat secara tidak langsung akan mempengaruhi sifat fungsionalnya (Kristinsson dan Rasco, 2000). Hidrolisat protein yang bagus memiliki kelarutan yang baik pada tingkat hidrolisis yang tinggi (Klompong *et al.*, 2007). Kelarutan hidrolisat protein yang tinggi pada rentang pH yang luas dapat berguna menjadi salah satu pilihan dalam formulasi ketika diaplikasikan pada produk. Karakteristik fungsional lainnya yang dapat dicapai ketika hidrolisis adalah adanya sifat pengemulsi pada hidrolisat protein (Gbogouri *et al.*, 2004).

Menurut Dewi (2016), hidrolisat protein ikan dapat menghasilkan karakteristik khusus berupa sifat antioksidan yang berasal dari peptida hasil pemecahan secara hidrolisis. Umayaparvathi *et al.* (2014), menjelaskan bahwa peptida antioksidan dari hidrolisat protein oyster (*Saccostrea cucullata*) yaitu Leu-Ala-Asn-Ala-Lys dengan bobot molekul 515,29 Da, Val-Lys-Val-Leu-Leu-Glu-His-Pro-Val-Leu dengan bobot molekul 1145,75 Da, serta peptida dengan sekuen Pro-Ser-Leu-Val-Gly-Arg-Pro-Pro-Val-Gly-Lys-Leu-Thr-Leu dengan bobot molekul

1432,89 Da. Saiga *et al.* (2003), memaparkan bahwa peptida yang bersifat antioksidan pada hidrolisat protein myofibril porcine menggunakan enzim papain tersusun oleh sekuen Glu-Glu-Leu-Asp-Asn-Ala-Leu-Asn dengan bobot molekul 916,9 Da.

Warna hidrolisat protein ditentukan oleh zat warna/pigmen yang terdapat pada sampel yang digunakan sebagai bahan baku. Warna yang timbul pada hidrolisat protein juga diakibatkan oleh reaksi pencoklatan non enzimatis (reaksi *Maillard*) selama proses hidrolisis, yakni reaksi antara gugus hidroksil pada gula dengan gugus amino atau protein (Bernadeta *et al.*, 2012). Beberapa kandungan komposisi kimia dasar yang dimiliki oleh hidrolisat protein secara komersil menurut *International Quality Ingredients* (2005), meliputi kadar air, kadar abu, kadar protein dan kadar lemak dibandingkan dengan hidrolisat protein limbah kepala udang (Fathony *et al.*, 2014) dalam bentuk serbuk sebagaimana dicantumkan dalam Tabel 2.

Tabel 2. Komposisi Kimia Hidrolisat Protein Ikan

Parameter	Hidrolisat Protein Ikan Komersil (% bb) [*]	Hidrolisat Protein Limbah Kepala Udang (%bb) ^{**}
Kadar protein (%)	73-75	65
Kadar air (%)	3-5	16
Kadar lemak (%)	19-22	3
Kadar abu (%)	4-7	13

Sumber: ^{*}) IQI, 2005

^{**}) Fathony *et al.*, 2014

Kandungan protein yang tinggi pada hidrolisat protein ikan dikarenakan pelarutan protein selama proses hidrolisis. Kandungan lemak yang rendah dari hidrolisat protein diakibatkan karena telah terjadi proses pemisahan fraksi lipid dan protein ketika sentrifugasi (Chalamaiah *et al.*, 2012). Kadar air yang rendah dari hidrolisat protein dikarenakan pemakaian suhu yang tinggi sehingga terjadi proses penguapan dan pengeringan pada sampel ketika mengubah dari bentuk cair ke bubuk. Kadar abu yang relatif tinggi pada hidrolisat diakibatkan karena

penambahan larutan asam atau basa ketika proses penyesuaian pH saat pembuatan hidrolisat protein (Nurhayati *et al.*, 2013).

Menurut *Food and Agricultural Organization* (2011), ada tiga jenis konsentrasi protein ikan. Jenis pertama yaitu tipe A (kadar lemak maksimum 0,75% kadar protein lebih dari 80%), tipe B (kadar lemak minimum 3% dengan kadar protein kurang dari 80%) dan tipe C (konsentrasi yang dibuat tidak higienis). Kadar air dari seluruh tipe KPI yaitu maksimal 10% dengan jumlah lisin minimum 6,7% dari total protein.

Proses hidrolisis yang terjadi saat pembuatan hidrolisat protein mengakibatkan pemutusan ikatan peptida sehingga terbentuk komponen yang lebih sederhana yaitu asam amino dan peptida. Kualitas dari hidrolisat protein yang dibuat dapat dilihat dari kandungan asam amino penyusunnya (Nurhayati *et al.*, 2013). Beberapa kandungan asam amino yang dimiliki oleh hidrolisat protein secara komersil menurut *International Quality Ingredients* (2005), dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Komposisi Asam Amino Hidrolisat Protein Komersil

Jenis Asam Amino	Hidrolisat Protein Ikan Komersil (% b/b)
Valin	4,90
Leusin	6,50
Isoleusin	4,00
Metionin	3,10
Treonin	4,40
Histidin	2,60
Lisin	7,50
Arginin	6,80
Fenilalanin	3,70
Asam aspartat	9,50
Asam glutamat	14,00
Serin	4,90
Glisin	11,00
Alanin	7,30
Tirosin	2,90

Sumber: IQI, 2005

2.3.4 Metode Pembuatan Hidrolisat Protein Ikan (HPI)

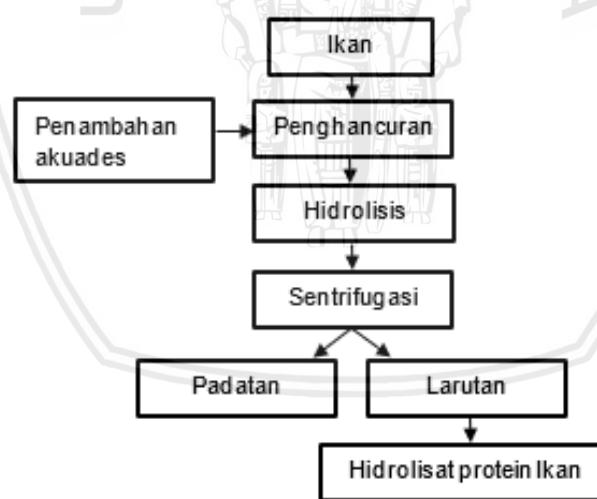
Pembuatan hidrolisat protein ikan (HPI) dapat dilakukan dengan beberapa metode, diantaranya dengan menggunakan bahan kimia (asam atau basa) dan biokimia (enzim baik dari mikroba maupun protease endogen dari ikan itu sendiri) pada tingkat yang sesuai (Ovissipour *et al.*, 2012). Peptida-peptida yang ada akan terhidrolisis dan terlepas menjadi peptida yang lebih kecil dari waktu ke waktu. Sifat-sifat peptida yang terlepas tersebut, tergantung pada jenis protease atau bahan kimia, pH, suhu dan waktu yang diterapkan selama hidrolisis pembuatan hidrolisat protein (Nazeer dan Anila, 2012).

Metode kimia dan biologi adalah metode yang paling banyak digunakan untuk produksi hidrolisat protein, contohnya penerapan metode kimia yang mendominasi pada skala industri. Dalam industri, melibatkan proses hidrolisis protein yang tinggi pada substrat menggunakan asam atau alkali. Bahan-bahan tersebut menyebabkan degradasi hidrolitik pada ikatan peptida yang menghubungkan asam amino pembentuk peptida protein, kemudian melepaskannya ke dalam larutan (Patel, 2009).

Pembuatan hidrolisat protein ikan telah dilakukan oleh Nurdiani *et al.* (2015), dengan sampel 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 dengan rasio ikan : akuades 1: 1, 1: 2 atau 1: 3 (b/v). 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.

Menurut Nurhayati *et al.* (2007), pembuatan HPI dengan penggunaan protease endogen secara singkat yaitu sampel halus yang digunakan ditambahkan akuades, kemudian dilakukan inkubasi selama beberapa waktu. Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit untuk mendapatkan lapisan hidrolisatnya. Menurut Kurniawan *et al.* (2012), proses inkubasi pembuatan hidrolisat protein harus dihentikan ketika telah muncul tanda-tanda penurunan kecepatan hidrolisis. Menurunnya kecepatan reaksi hidrolisis protein disebabkan oleh beberapa hal, yaitu penurunan ikatan peptida spesifik bagi enzim, inhibisi produk, inaktivasi enzim dan kestabilan molekul enzim yang mempengaruhi pengikatan enzim dengan substrat. Prinsip pembuatan hidrolisat protein ikan sesuai dengan diagram alir pada Gambar 3.



Gambar 2. Prinsip Pembuatan Hidrolisat Protein Ikan (HPI)
(Sumber: Nurhayati *et al.*, 2007)

2.3.5 Manfaat Hidrolisat Protein Ikan (HPI)

Salah satu contoh pemanfaatan hidrolisat protein ikan adalah untuk pembuatan pepton yang digunakan sebagai media pertumbuhan mikroorganisme dan dibutuhkan dalam perkembangan bioteknologi (Wijayanti, 2009). Hidrolisat

protein ikan pada industri pangan dapat ditambahkan ke dalam suplemen makanan diet dan pada industri farmasi digunakan untuk pembuatan produk-produk berbasis dermatologis, seperti krim pembersih muka dan pelembap kulit. Selain itu, hidrolisat protein ikan dapat digunakan secara fungsional sebagai bahan pengemulsi (Schimidi *et al.*, 1994). Aplikasi hidrolisat saat ini mencakup penambahan nutrisi yang dibutuhkan ke sistem fermentasi untuk mendukung mikroorganisme menghasilkan metabolit primer dan sekunder dengan optimal, hingga menjadi sarana pengembangan bioteknologi dibidang industri dan penggabungannya dalam biofarmasi (Pasupuleti dan Demain, 2010). Perkembangan pemanfaatan hidrolisat sesuai dengan ilustrasi pada Gambar 2.



Gambar 3. Pengembangan Pemanfaatan Hidrolisat Protein
(Sumber: Pasupuleti dan Demain, 2010)

Hidrolisat protein hasil hidrolisis melalui fermentasi dapat menghasilkan peptida bioaktif yang bersifat antioksidan (Torino *et al.*, 2012). Berdasarkan penelitian terdahulu yang dilakukan oleh Jemil *et al.* (2014), hidrolisat protein dari ikan pari (*Dasyatis pastinaca*) yang difermentasi menggunakan *B. subtilis* A26 memiliki aktivitas antioksidan terhadap radikal bebas DPPH sebesar 75% pada konsentrasi 6 mg/mL. Ruthu *et al.* (2012), juga melaporkan bahwa hidrolisat protein ikan yang diperoleh dari limbah kepala ikan carps yang difermentasi menggunakan bakteri asam laktat (*E. faecium* NCIM 3553) memiliki aktivitas antioksidan terhadap radikal bebas DPPH sebesar 50% pada konsentrasi 5 mg/ml.

2.4 pH Hidrolisis

Hidrolisis pada hidrolisat yang dibuat didasari pada kerja enzim protease endogen yang sudah ada pada bahan. Diketahui bahwa enzim merupakan protein jadi peka terhadap perubahan pH, dan pada pH yang terlalu tinggi atau terlalu rendah, enzim akan mengalami denaturasi. Oleh karena itu, enzim bekerja sangat spesifik, dan pH optimum untuk masing-masing enzim tidak selalu sama (Sari, 2004). Masing-masing enzim yang digunakan mempunyai sifat spesifik tertentu, artinya akan bekerja jika kondisi proses terkontrol untuk aktivitas enzimatiknya. Enzim yang ada pada pencernaan dan kepala biasanya merupakan enzim protease yang mempunyai gugus aktif sulfhidril, beraktivitas pada pH mendekati netral antara pH 6-8 (Reed, 1975).

Menurut Bhaskara *et al.* (2007), pH optimum pada saat terjadinya hidrolisis pembuatan hidrolisat tergantung pada aktivitas enzim protease endogen atau enzim yang ditambahkan. Aktivitas enzim protease endogen terbagi menjadi 3 suasana pH, yaitu dalam keadaan asam, netral maupun basa. Pada penelitian mengenai pembuatan hidrolisat protein yang berasal dari limbah ikan patin menggunakan enzim protease endogen di kepala dan isi perut optimum pada pH 9.4 dengan protease yang ditemukan yaitu tripsin, kemotripsin, serin protease dan alkalase (Amiza *et al.*, 2013). Sedangkan protease endogen yang teridentifikasi pada hidrolisat ikan sarden (terdapat campuran saluran pencernaannya) optimum pada pH 3-5 dengan protease yang temukan yaitu pepsin (Benhabiles *et al.*, 2012).

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).

2.5 Lama Hidrolisis

Lama hidrolisis merupakan salah satu faktor yang menentukan terbentuknya kompleks enzim dan substrat. Laju hidrolisis enzimatis menurun dan mencapai stasioner ketika tidak terjadi proses hidrolisis secara nyata oleh enzim. Sejumlah besar hidrolisat protein terlarut dihasilkan ketika tahap awal hidrolisis, namun ketika sejumlah enzim ditambahkan ketika fase stasioner dari proses hidrolisis tidak terjadi peningkatan hasil hidrolisis (Shahidi *et al.*, 1995).

Menurut Zamora dan Hidalgo (2001), hasil pengaruh lama waktu hidrolisis terhadap aktivitas antioksidan hidrolisat menunjukkan bahwa pengurangan waktu inkubasi ketika hidrolisis menurunkan peluang terjadinya oksidasi lipid dan juga menurunkan efek penghambatan peroksidasi terhadap protolisis. Terjadinya oksidasi selama hidrolisis yang mampu menurunkan efek penghambatan peroksidase, dimungkinkan dapat menyebabkan penghambatan pelekatan enzim pada substrat. Proses hidrolisis perlu dilakukan pada keadaan yang minim oksigen (Liu *et al.*, 2000).

Secara umum kandungan α -amino nitrogen bebas cenderung meningkat dengan semakin lamanya waktu hidrolisis. Hal ini disebabkan karena semakin lama jangka waktu hidrolisis maka proses hidrolisis berjalan lebih sempurna. Hal ini tentunya berimplikasi terhadap peningkatan kandungan α -amino nitrogen bebas (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).

3. METODE PENELITIAN

3.1 Alat dan Bahan

3.1.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian yakni terdiri dari alat untuk pembuatan hidrolisat protein dari kepala ikan kakatua (*Chlorurus sordidus*) dan alat untuk analisa. Alat-alat yang digunakan yang digunakan dalam pembuatan hidrolisat protein dari kepala ikan kakatua diantaranya adalah *coolbox*, ember, pisau, telenan, baskom, mesin penghalus daging, *beaker glass* 500 ml, *beaker glass* 100 ml, *washing bottle*, mortar dan alu, pH meter, pipet serologis 1 mL, pipet volume 10 mL, pipet tetes, bola hisap, labu ukur 250 dan 100 mL, gelas ukur, spatula, timbangan digital, sentrifuge, cuvet sentrifuge, botol balsem, nampan, pH *paper*, penggiling daging, corong dan *shaker*.

Adapun alat yang digunakan untuk analisa hidrolisat protein dari kepala ikan kakatua yakni spatula, timbangan digital, gelas ukur, labu ukur, pipet serologis, oven, botol film, botol vial, pipet volume, mikropipet, alat kjeldahl, oven, topless, alat SDS PAGE, tanur, cawan porselen, benang kasur, desikator, *waterbath*, erlenmeyer, alat soxhlet serta berbagai peralatan dalam uji karakteristik hidrolisat protein.

3.1.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam pembuatan hidrolisat protein dari kepala ikan kakatua adalah limbah kepala ikan kakatua (*Chlorurus sordidus*) yang diperoleh dari pabrik PT Alam Jaya, Rungkut Surabaya. Bahan lain yang digunakan adalah: akuades, HCl 6N, NaOH 6N, kertas kosong, kertas label, plastik, alumunium foil, air dan es curai.

Adapun bahan-bahan yang digunakan untuk pengujian antara lain : plastik, kertas label, tisu, DPPH, metanol 95%, akuades, TCA, pelarut heksan, boraks, kertas saring, NaOH, HCl 0.2N, HCl 6N, 0.5M Tris-HCl (pH 6,8), 1.5M Tris-HCl (pH 8,8), acrylamide, larutan SDS, *Commasie Brilliant Blue R-250*, Asam Asetat Glasial, APS, TEMED, *Bromophenol Blue*, K₂SO₄, HgO, H₂SO₄ dan es.

3.2 Metode Penelitian

3.2.1 Metode

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pH dan lama hidrolisis yang berbeda terhadap karakteristik hidrolisat protein dari kepala ikan kakatua (*Chlorurus sordidus*). Metode yang dilakukan dalam penelitian ini adalah metode eksperimental. Menurut Nazir (2014), metode eksperimental merupakan suatu metode observasi di bawah kondisi buatan (*artificial condition*) dimana kondisi tersebut oleh peneliti diatur dan dibuatnya sehingga penelitian dilakukan dengan memanipulasi suatu objek yang akan diteliti serta adanya suatu kontrol terhadap obyek tersebut. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menyelidiki adanya hubungan sebab-akibat serta seberapa besar hubungan tersebut. Penelitian ini dilakukan dengan memberikan perlakuan-perlakuan tertentu pada obyek eksperimen dan menyediakan kontrol untuk perbandingan.

Penelitian secara eksperimental kebanyakan dilakukan dalam laboratorium atau suatu tempat dalam kondisi terkendali dan merupakan bagian dari penelitian kuantitatif. Penelitian dengan metode ini terdiri dari pra eksperimen (penelitian pendahuluan), eksperimen sesungguhnya dan eksperimen faktorial serta eksperimen quasi (Kumalaningsih, 2012).

3.2.2 Variabel Penelitian

Variabel adalah objek penelitian, atau apa yang menjadi titik perhatian suatu penelitian (Arikunto, 2006). Dalam variabel dibagi atas dua jenis, yakni

variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas adalah variabel yang diselidiki pengaruhnya, sedangkan variabel terikat adalah variabel yang diperkirakan akan timbul sebagai pengaruh dari variabel bebas (Surakhmad,1994).

Variabel-variabel dalam penelitian ini terdiri dari variable bebas dan terikat, yakni:

- a. variabel bebas yaitu pH hidrolisis (5, 7, 9 dan tanpa mengubah pH bahan) serta lama hidrolisis (12 jam dan 24 jam) pada penelitian utama.
- b. variabel terikat yaitu rendemen, aktivitas antioksidan, derajat hidrolisis (DH), kadar air, kadar abu, kadar lemak, kadar protein, berat molekul dan komposisi asam amino dari hidrolisat protein.

3.3 Rancangan Penelitian

3.3.1 Rancangan Penelitian Pendahuluan

Penelitian pendahuluan dilakukan untuk mengetahui rasio terbaik sampel dan akuades (b/v) pembuatan hidrolisat protein kepala ikan kakatua yang akan digunakan pada penelitian utama. Perlakuan yang dilakukan meliputi 4 rasio sampel : larutan pengencer, yaitu 1:0; 1:1; 1:2 dan 1:3 (b/v), mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh Nurdiani *et al.* (2015), dengan modifikasi. Pada penelitian ini, perlakuan terbaik didasarkan pada hasil rendemen dan aktivitas antioksidan HPI. Penelitian pendahuluan dilakukan dengan 4 perlakuan dan 3 kali ulangan, sehingga didapatkan 12 satuan perlakuan. Kombinasi perlakuan dan ulangan pada penelitian pendahuluan dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Kombinasi Perlakuan dan Ulangan pada Penelitian Pendahuluan

Perlakuan Rasio (b/v)	Berat Sampel (gr)	Volume Larutan Pengencer (ml)	Ulangan			Rata- rata
			1	2	3	
1:0	20	0				
1:1	20	20				
1:2	20	40				
1:3	20	60				

3.3.2 Rancangan Penelitian Utama

Penelitian utama dilakukan dengan menggunakan hasil rasio antara sampel dan larutan 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. Hal-hal yang mempengaruhi dari aktivitas enzim protease endogen diantaranya kesesuaian pH, rentang waktu hidrolisis, tekanan dan suhu (Fernandes, 2016). Untuk mengetahui efek pH terhadap aktivitas enzim protease endogen yang optimal maka dapat dilakukan dengan penerapan pH dari 4 sampai 11 (Sabtecha *et al.*, 2014). Sedangkan untuk mengetahui efek waktu yang diberikan terhadap tingkat hidrolisis dan pemutusan ikatan peptida dilakukan dengan menggunakan variasi lama hidrolisis (6, 12, 24, 36 dan 48 jam) yang memberikan hasil hidrolisis yang meningkat sampai keadaan stasioner (Utomo *et al.*, 2014).

Berdasarkan acuan diatas, pada penelitian utama menggunakan variasi pH (5, 7 dan 9) yang mewakili dasar dari kondisi optimal adanya protease endogen asam, netral maupun basa yang dibandingkan dengan perlakuan kontrol yaitu tanpa mengubah pH bahan (pH 6,4). Lama hidrolisis (12 dan 24 jam) yang berbeda untuk mengetahui kondisi yang optimal dari proses pembuatan hidrolisat protein kepala ikan kakatua yang merupakan range ikubasi dari titik tengah (18 jam) pada penelitian pendahuluan.

Analisa data yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial dengan dua faktor. Faktor pertama adalah pH hidrolisis yang terdiri dari 4 perlakuan, serta faktor kedua adalah lama hidrolisis yang terdiri dari 2 perlakuan. Sehingga dalam penelitian ini diperoleh 4×2 kombinasi atau 8 kombinasi.

Faktor I adalah pH hidrolisis yang terdiri dari 3 perlakuan, yakni:

A1 = 5

A3 = 9

A2 = 7

A4 = 6,4 (kontrol)

Faktor II adalah lama hidrolisis yang terdiri dari 2 perlakuan, yakni:

B1 = 12 Jam

B2 = 24 Jam

Penentuan banyaknya ulangan RAL faktorial menurut Hanafiah (2016), menggunakan rumus sebagai berikut:

$$(t-1) (r-1) \geq 15 \quad r = 22$$

$$(8-1) (r-1) \geq 15 \quad r \approx 3$$

$$7r - 7 \geq 15$$

Keterangan: t = treatment / perlakuan

r = replikasi / ulangan

15 = derajat bebas

Berdasarkan rumus diatas, dalam penelitian ini setiap perlakuan dilakukan 3 kali ulangan, sehingga akan menghasilkan 24 kombinasi perlakuan, yakni 3×8 kombinasi. Adapun kombinasi perlakuan antara pH dan lama hidrolisis disajikan pada Tabel 5.

Tabel 5. Kombinasi Perlakuan antara pH dan Lama Hidrolisis

pH Hidrolisis (A)	Lama Hidrolisis (B)	Ulangan			Total	Rata-rata
		1	2	3		
A1	B1	A1B1	A1B1	A1B1		
	B2	A1B2	A1B2	A1B2		
A2	B1	A2B1	A2B1	A2B1		
	B2	A2B2	A2B2	A2B2		
A3	B1	A3B1	A3B1	A3B1		
	B2	A3B2	A3B2	A3B2		
A4	B1	A4B1	A4B1	A4B1		
	B2	A4B2	A4B2	A4B2		

Langkah selanjutnya yaitu membandingkan antara F hitung dengan F tabel.

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

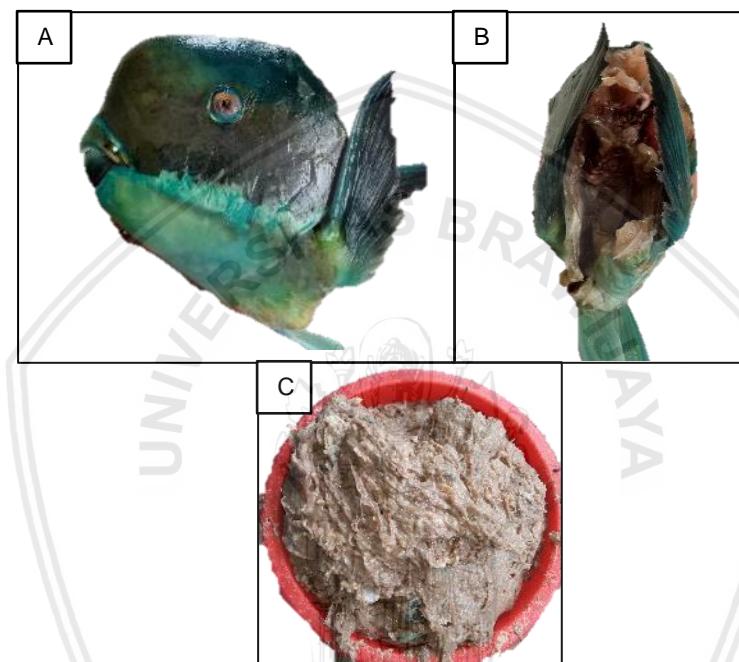
Apabila dari hasil perhitungan didapatkan perbedaan yang nyata ($F_{hitung} > F_{tabel\ 5\%}$) maka dilakukan uji lanjut Tukey pada taraf 5 % untuk melihat sebaran data. Penentuan perlakuan terbaik dengan menggunakan *Response Surface Methodology* (RSM) yang disajikan dalam *Overlaid Contour Plot* dari hasil beberapa parameter. Analisa tersebut dilakukan dengan menggunakan aplikasi Minitab versi 18.

3.4 Prosedur Penelitian

Dalam penelitian ini terdiri dari 3 tahapan, yakni preparasi sampel, penelitian pendahuluan dan penelitian utama. Preparasi sampel merupakan tahap awal penelitian dimana pada tahap ini dilakukan penggilingan sampel limbah kepala ikan kakatua (*Chlorurus sordidus*) hingga halus. Adapun tujuan dari penelitian pendahuluan adalah untuk melakukan percobaan agar saat penelitian utama mengetahui rasio antara sampel dan larutan pengencer (b/v) yang terbaik dalam pembuatan hidrolisat protein kepala ikan kakatua. Sedangkan penelitian utama bertujuan untuk mendapatkan hidrolisat protein dari limbah kepala ikan kakatua dengan menggunakan perbandingan antara sampel dan larutan pengencer (b/v) terbaik dari hasil penelitian pendahuluan serta mengetahui pengaruh pH dan lama hidrolisis terhadap karakteristik hidrolisat protein dari kepala ikan kakatua (*Chlorurus sordidus*).

3.4.1 Preparasi Sampel

Preparasi diawali dengan pengambilan sampel limbah kepala ikan kakatua (*Chlorurus sordidus*) yang didapat dari pabrik PT Alam Jaya Sea Food di Jalan Raya Rungkut Industri II Nomor 25, Tenggilis Mejoyo, Kota Surabaya. Sampel kepala merupakan limbah dari hasil pengolahan *fillet* daging ikan kakatua. Sampel limbah kepala ikan kakatua seperti pada Gambar 4.



Gambar 4. Sampel Limbah Kepala Ikan Kakatua (*Chlorurus sordidus*)
A=Sampel kepala ikan tampak samping, B=Sampel kepala ikan tampak
belakang, dan C=Sampel halus kepala ikan
(Sumber: Dokumen Pribadi, 2019)

Kepala ikan kakatua selanjutnya dicacah dan digiling dengan menggunakan mesin penggiling daging di Pasar Landungsari, Dau, Kota Malang. Sampel halus ini dimasukan kedalam beberapa plastik agar memudahkan proses *thawing*, diberi label dan dimasukkan kedalam freezer dengan suhu -4°C di Laboratorium Hidrobiologi, Divisi Sumberdaya Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya.

3.4.2 Penelitian Pendahuluan

Penelitian pendahuluan diawali dengan melakukan percobaan pembuatan hidrolisat protein dari kepala ikan kakatua (*Chlorurus sordidus*) dengan perbandingan rasio sampel dan larutan pengencer (b/v) yang berbeda yaitu 1:0; 1:1; 1:2 dan 1:3 seperti yang dijelaskan oleh Nurdiani *et al.* (2015), dengan modifikasi.

Pembuatan hidrolisat protein dari kepala ikan kakatua meliputi proses pencacahan sampel limbah kepala dan kemudian dihaluskan. Sampel yang telah halus kemudian diambil sebanyak 20 gram dan ditambahkan akuades sebanyak 1:0; 1:1; 1:2 dan 1:3 (b/v) dalam *beaker glass* 100 ml, lalu diaduk menggunakan spatula supaya merata. Sampel yang sudah tercampur dengan akuades ditimbang menggunakan timbangan digital untuk mengetahui beratnya. Sebagian kecil sampel halus yang belum tercampur dengan akuades disisakan untuk diuji komposisi proksimat awal sampel. Dilakukan pemeriksaan pH pada sampel yang sudah tercampur dengan menggunakan pH meter.

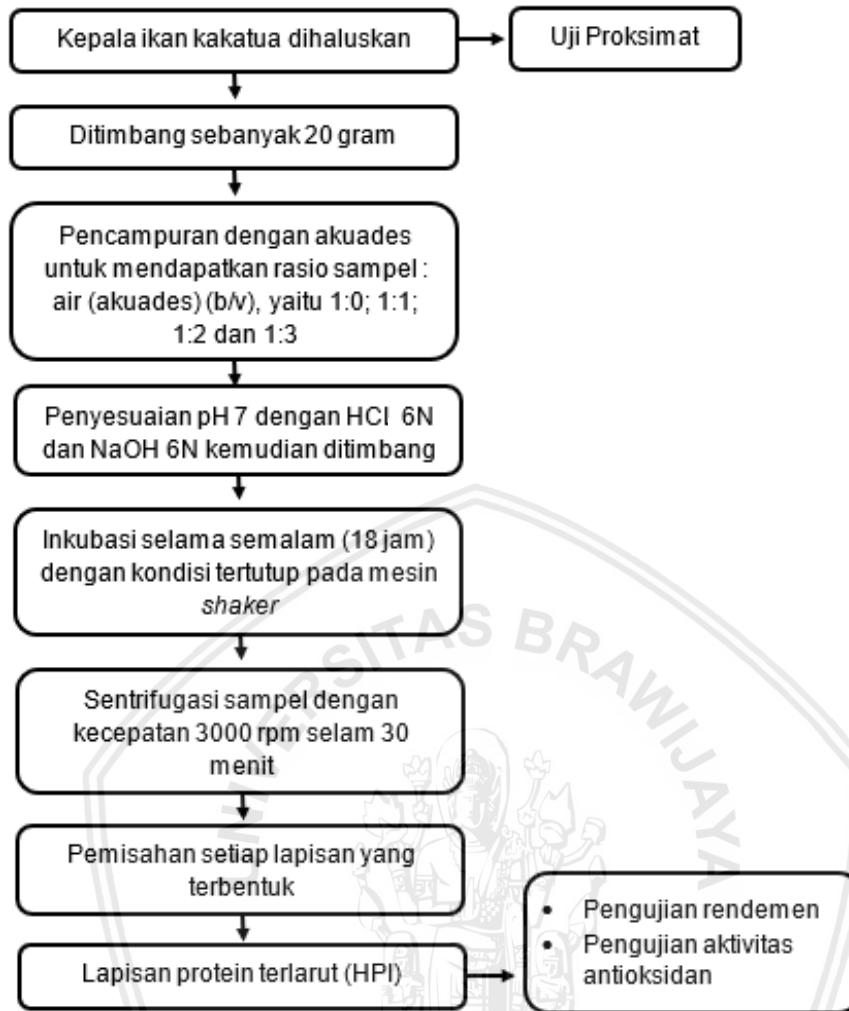
Pengukuran pH dilanjutkan untuk mencapai pH 7 dengan menggunakan *buffer* (HCl 6N dan NaOH 6N). Perhitungan pembuatan larutan HCl 6N dan NaOH 6N dapat dilihat pada Lampiran 10. Proses hidrolisis menggunakan enzim protease dengan pH 7 disamakan dengan aktivitas enzim endogen di usus. Menurut Yamin *et al.* (2008), enzim ini aktif pada kisaran pH netral. Secara umum enzim protease endogen 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.

Setelah penyesuaian pH, maka dapat dilanjutkan ketahap inkubasi selama semalam (18 jam) dengan kondisi tertutup pada mesin *shaker* untuk memastikan terjadinya proses hidrolisis pada sampel. Proses hidrolisis dilakukan selama 18

jam sesuai dengan penelitian Nurdiani *et al.* (2016), menunjukkan pemisahan fraksi lemak dan protein terlarut optimal dengan lama inkubasi semalam atau 18 jam. Inkubasi menggunakan *shaker* agar sampel tercampur secara homogen.

Sampel yang sudah diinkubasi selama semalam disentrifuge pada kecepatan 3000 rpm selama 30 menit. Menurut Nurdiani *et al.* (2015), pemisahan fraksi protein terlarut dapat dilakukan dengan tahapan fraksinasi menggunakan alat sentrufe. Kecepatan yang diterapkan pada kisaran 2500-5000 tergantung pada waktu yang diterapkan. Sentrifuge berguna untuk memisahkan sampel kedalam 5 lapisan yaitu lapisan minyak, lapisan *light lipoprotein*, lapisan protein terlarut, lapisan partikel halus dan lapisan partikel kasar. Setiap lapisan kemudian dipisah dan ditimbang untuk mengetahui beratnya, terlebih lapisan protein terlarut yang menjadi hasil dari hidrolisat protein kepala ikan (HPI).

Perhitungan rendemen dilakukan untuk masing-masing lapisan. Lapisan protein terlarut diukur aktivitas antioksidannya menggunakan metode DPPH. Perlakuan dengan hasil rendemen dan aktivitas antioksidan lapisan protein terlarut terbaik maka dilanjutkan kedalam tahap penelitian utama. Diagram alir penelitian pendahuluan pembuatan hidrolisat protein dari kepala ikan kakatua (*Chlorurus sordidus*) dengan perbandingan antara sampel dan larutan pengencer (b/v) yang berbeda disajikan pada Gambar 5.

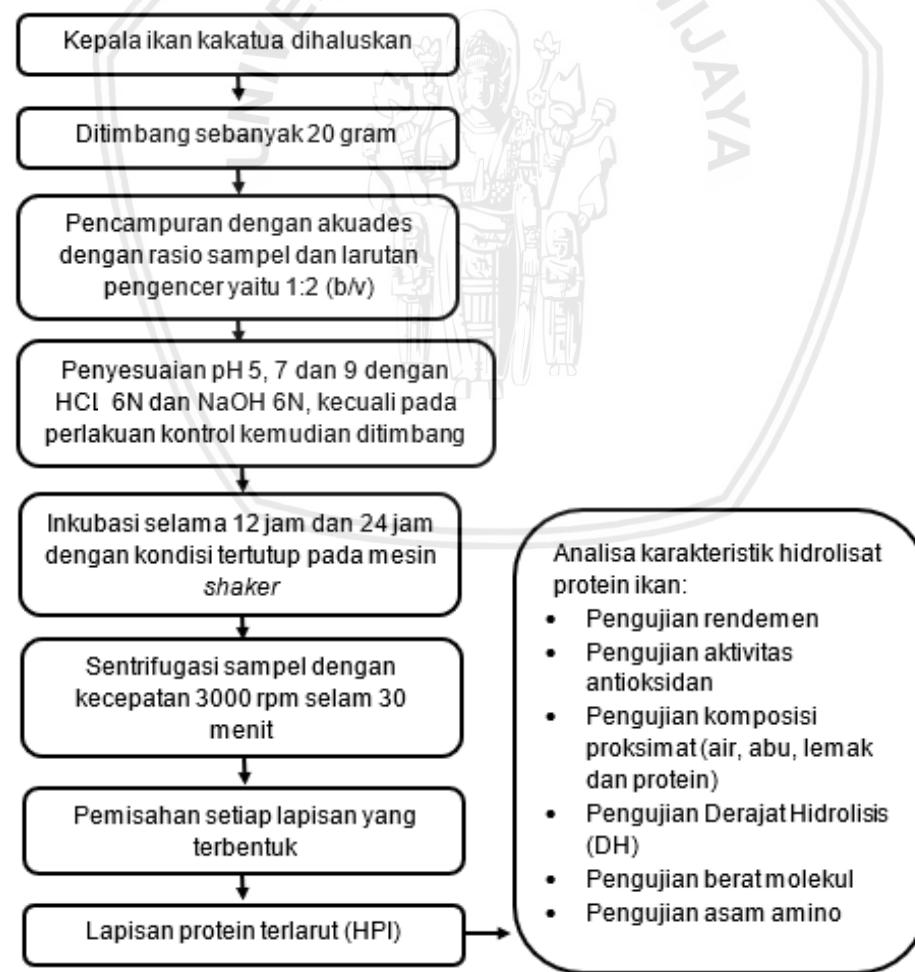


Gambar 5. Diagram Alir Penelitian Pendahuluan Pembuatan Hidrolisat Protein Kepala Ikan Kakatua dengan Perbandingan Rasio Sampel dan Larutan Pengencer yang Berbeda (Modifikasi dari Nurdiani *et al.*, 2015)

3.4.2 Penelitian Utama

Pada penelitian utama, proses pembuatan hidrolisat protein dari kepala ikan kakatua (*Chlorurus sordidus*) menggunakan metode yang sama seperti yang telah dilakukan pada penelitian pendahuluan namun dengan menggunakan hasil rasio antara sampel dan larutan pengencer (b/v) terbaik dari penelitian pendahuluan. Kemudian dilakukan penerapan perlakuan pH hidrolisis (5, 7 dan 9) kecuali pada perlakuan kontrol yaitu tanpa mengubah pH bahan (pH 6,4) dan diinkubasi selama 12 dan 24 jam. Pemilihan pH yang berbeda pada perlakuan

mengacu pada Sabtecha *et al.* (2014), bahwa untuk mengetahui keadaan optimal protease endogen pada ikan yaitu dengan menerapkan kondisi pH umumnya (pH 4-11) yang mewakili keadaan asam, netral dan basa. 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. Menurut Bautista (1999), semakin lama waktu ekstraksi maka mempengaruhi banyaknya protein yang terlarut. Setelah diperoleh lapisan protein terlarut sebagai hidrolisat protein, lalu dilakukan analisa karakteristik hidrolisat protein. Skema pembuatan hidrolisat protein dari kepala ikan kakatua lebih jelasnya dapat dilihat pada Lampiran 1. Diagram alir penelitian utama pembuatan hidrolisat protein dari kepala ikan kakatua disajikan pada Gambar 6.



Gambar 6. Pembuatan Hidrolisat Protein Kepala Ikan Kakatua (Modifikasi dari Nurdiani *et al.*, 2015)

3.5 Analisa Karakteristik Hidrolisat Protein Ikan

3.5.1 Rendemen (Purbasari, 2008)

Rendemen merupakan salah satu parameter yang penting dalam melihat pengaruh perlakuan terhadap hasil akhir produk. Rendemen merupakan jumlah persentase sampel akhir setelah proses dan dinyatakan dalam % (persen). Rendemen produk hidrolisat protein merupakan persentase banyaknya produk hidrolisat yang dihasilkan terhadap bahan baku yang digunakan sebelum hidrolisis.

$$\text{Rendemen} = \frac{A}{B} \times 100\%$$

Keterangan:

A = Berat akhir hidrolisat (setelah disentrifuge) (gram)

B = Berat awal sampel setelah pencampuran (sebelum di inkubasi) (gram)

3.5.2 Aktivitas Antioksidan (Donkor et al., 2012 dengan modifikasi)

Pengujian aktivitas antioksidan pada sampel hidrolisat protein menggunakan metode penangkapan radikal bebas DPPH. Diambil sebanyak 100 μL ekstrak protein terlarut (hidrolisat protein) lalu ditambahkan ke dalam 3900 μL 0,075 mM DPPH dalam metanol 95%. Sampel yang telah tercampur kemudian dibiarkan dalam kondisi gelap selama 1 jam. Setelah diinkubasi akan terjadi perubahan warna menjadi kekuningan. Diukur nilai absorbansi campuran larutan tersebut pada panjang gelombang 517 nm menggunakan spektrofotometer UV / Visible Spectrophotometer (Lab. Pengolahan Hasil Perikanan, FPIK, UB). Nilai absorbansi yang lebih rendah menandai sifat penangkapan DPPH yang lebih tinggi. Air digunakan sebagai sampel larutan blanko. Diagram alir pengujian aktivitas antioksidan disajikan pada Lampiran 2. Perhitungan dalam pembuatan larutan DPPH 0,075 mM dalam metanol dapat dilihat pada Lampiran 11. Aktivitas

antioksidan ditunjukkan dengan prinsip persentase inhibisi atau proses penangkapan radikal bebas yang dapat dihitung dalam persamaan berikut:

$$\% \text{ inhibisi} = \left[\frac{\text{Absorbansi blanko} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi blanko}} \right] \times 100\%$$

3.5.3 Kadar Protein (AOAC, 2005)

Penentuan kadar protein dilakukan dengan metode kjeldahl. Kadar protein ditentukan dengan menimbang sampel hidrolisat protein cair sebanyak 1 gram dan dimasukkan ke dalam labu kjeldahl 30 ml. Kemudian ditambah 2 gr K_2SO_4 , 50 mg HgO dan 15 ml H_2SO_4 . Sampel didestruksi selama 1-1,5 jam sampai cairan berwarna hijau jernih lalu didinginkan dan ditambah 50 ml akuades 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 250 ml yang berisi 100 ml boraks 3% dan dititrasi dengan H_2SO_4 0.1N sampai terjadi perubahan warna menjadi merah muda pertama kali. Perhitungan pembuatan larutan H_2SO_4 0.1N dapat dilihat pada lampiran 12. Diagram pengujian kadar protein disajikan pada Lampiran 3. Perhitungan kadar protein menggunakan rumus:

$$\% \text{ N} = \frac{(\text{ml HCl} - \text{ml blanko}) \times 14.007 \times \text{N HCl}}{\text{mg sampel}} \times 100\%$$

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

3.5.4 Derajat Hidrolisis (DH) (Hoyle dan Merritt, 1994 dengan modifikasi)

Penentuan derajat hidrolisis hidrolisat protein terlarut ditentukan berdasarkan perhitungan % N. Sebanyak 2 mL HPI cair (lapisan protein terlarut) ditambahkan TCA 20% (b/v) sebanyak 2 mL. Campuran sampel tersebut kemudian didiamkan selama 30 menit agar terjadi pengendapan, kemudian disentrifugasi (kecepatan 5000 rpm, selama 30 menit menit). Supernatan dianalisis kadar nitrogennya menggunakan metode Kjeldahl (AOAC, 1995). Diagram alir

pengujian derajat hidrolisis disajikan pada Lampiran 4. Derajat hidrolisis dihitung menggunakan rumus berikut:

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

3.5.5 Berat Molekul (SDS PAGE) (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 hidrolisat protein diambil sebanyak 15 µL dicampur dengan 15 µL campuran larutan *buffer loading* 12 µL dan bromophenol blue 0,1% 3 µL. Campuran tersebut dipanaskan pada suhu 95°C dalam *waterbath* sampai sampel benar-benar terlarut kurang lebih 5-10 menit. Pembuatan gel dilakukan dua tahap yaitu gel *separating* dan gel *stacking*. Tahap pertama membuat gel *separating* dengan mencampurkan larutan yang terdiri atas akuades 3,1 ml, 30% acrylamide 4,2 ml, 1.5M Tris-HCl (pH 8,8) 2,5 ml, larutan 10% SDS 0,1 ml, larutan APS 0,1 ml dan TEMED 4µL. Kemudian dilanjutkan dengan membuat gel *stacking* dengan mencampurkan larutan yang terdiri atas akuades 1,7 ml, larutan 30% acrylamide 0,5 ml, 0,5M Tris-HCl (pH 6,8) 0,7 ml, larutan 10% SDS 0,03 ml, larutan APS 0,1 ml dan TEMED 4 µL. Perhitungan pembuatan larutan 0,5M Tris-HCl (pH 6,8) dan 1,5M Tris-HCl (pH 8,8) dapat dilihat pada Lampiran 13.

Standar SDS-PAGE digunakan untuk memperkirakan berat molekul protein. Sebanyak 15 µL sampel uji dan 4 µL larutan standar berat molekul (*marker*) dimasukkan ke dalam sumur gel (*well gel*). Gel dijalankan pada 20 mA dan 100 V selama 3 jam. Gel kemudian ditempatkan dalam larutan *staining* (*Commasie Brilliant Blue R-250* 1 gram, metanol 450 ml, asam asetat glasial 100 ml dan akuades 450 ml) selama 2 menit dengan keadaan dipanaskan di dalam

microwave. Penghilangan warna dilakukan pada gel dengan mengganti akuades yang merendam gel setiap 5 menit selama 6 kali dan didiamkan selama 24 jam. Perhitungan berat molekul dianalisis dengan melihat pita protein yang terbentuk dan dibandingkan dengan standar (*marker*). Penentuan berat molekul melalui analisa jarak menggunakan *software* ImageJ kemudian dihitung persamaan kurvanya. Diagram alir pengujian berat molekul SDS-PAGE dapat dilihat pada Lampiran 5.

3.5.6 Kadar Air (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. Hal yang pertama dilakukan adalah sampel bubuk hidrolisat protein sebanyak 2 gram dan diletakkan dalam cawan kosong yang sudah ditimbang beratnya, dimana cawan dan tutupnya sebelumnya telah dikeringkan di dalam oven serta didinginkan di dalam desikator. Cawan yang berisi sampel kemudian ditutup dan dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 100-102 °C selama 6 jam. Cawan tersebut lalu didinginkan di dalam desikator dan setelah dingin cawan ditimbang. Diagram pengujian kadar air disajikan pada Lampiran 6. Kadar air dapat dihitung dengan rumus:

$$\text{Kadar Air (\%)} = \frac{W_1 - W_2}{\text{Berat sampel}} \times 100\%$$

Keterangan:

W₁ = berat (sampel + cawan) sebelum dikeringkan

W₂ = berat (sampel + cawan) setelah dikeringkan

3.5.7 Kadar Abu (AOAC, 2005)

Pengujian kadar abu dilakukan untuk menunjukkan kandungan mineral pada suatu bahan. Penentuan kadar abu pada hidrolisat protein dilakukan bertujuan untuk mengetahui baik tidaknya proses ekstraksi dan mengetahui parameter nilai gizi. Prosedur penentuan kadar abu dilakukan dengan cara menimbang sebanyak 1 gram sampel serbuk hidrolisat protein dan dimasukkan ke dalam cawan porselen yang telah ditimbang dan dibakar di dalam tanur dengan suhu 600°C serta didinginkan dalam desikator. Cawan yang berisi sampel dimasukkan ke dalam tanur pengabuan dan dibakar sampai didapat abu yang berwarna keabu-abuan. Pengabuan ini dilakukan dalam dua tahap, yaitu pertama diarangkan dengan kompor listrik hingga tidak ada asap dan kedua diabukan pada suhu 550°C dengan menggunakan tanur selama 5 jam. Cawan yang berisi abu tersebut didinginkan dalam desikator dan kemudian ditimbang. Diagram pengujian kadar abu disajikan pada Lampiran 7.

Kadar abu dihitung dengan rumus:

$$\text{Kadar Abu (\%)} = \frac{B_2 - B_1}{\text{Berat sampel}} \times 100\%$$

3.5.8 Kadar Lemak (AOAC, 2005)

Kadar lemak suatu bahan mempengaruhi perubahan mutu suatu produk selama penyimpanan. Metode soxhlet merupakan suatu metode analisis kadar lemak dengan prinsip melarutkan lemak yang terkandung dalam bahan, dimana bahan akan dibasahi pelarut dan terekstrak. Pelarut akan menguap dan lemak akan terakumulasi dalam wadah pelarut.

Penentuan kadar lemak menggunakan metode soxhlet, langkah awal yang dilakukan Labu lemak di oven menggunakan suhu 105°C selama 30 menit, lalu dipindahkan ke dalam desikator selama 15 menit. Kemudian ditimbang beratnya

dan dicatat sebagai (W_1). Sampel serbuk hidrolisat protein ditimbang sebanyak 1 g (W_2) lalu dibungkus dengan kertas saring dan diletakkan pada *timble* soxhlet yang dipasang diatas kondensor serta labu lemak di bawahnya. Pelarut heksana dituangkan ke dalam labu lemak sebanyak 30 ml. Diekstraksi selama kurang lebih 6 jam. Labu lemak yang berisi lemak hasil ekstraksi kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 105 °C selama 5 jam. Kemudian didinginkan dalam desikator selama 15 menit, selanjutnya ditimbang dan dicatat sebagai (W). Diagram pengujian kadar lemak disajikan pada Lampiran 8. Kadar lemak dapat dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Kadar lemak (\%)} = \frac{W - W_1}{W_2} \times 100\%$$

Keterangan:

W = Berat labu lemak + lemak hasil ekstraksi (g)

W_1 = Berat labu lemak sebelum diekstraksi (g)

W_2 = Berat sampel (g)

3.5.9 Penentuan Perlakuan Terbaik

Menurut Nurmiah *et al.* (2013), perlakuan terbaik dapat diketahui melalui nilai optimasi dengan menggunakan metode *Response Surface Methodology* (RSM) yang menunjukkan kondisi terbaik dari pertemuan semua fungsi tujuan. Menurut Wahjudi (1999), RSM merupakan suatu metode gabungan yang digunakan untuk menganalisa suatu respon yang dipengaruhi oleh beberapa variabel bebas/faktor guna mengoptimalkan respon tersebut. Penggunaan RSM untuk menentukan perlakuan terbaik mengacu pada Putra (2012), pertama-tama dilakukan prediksi terhadap nilai pH dan lama hidrolisis yang optimum, kemudian data digunakan untuk menentukan batas atas dan batas bawah. Penelitian menggunakan 2 faktor berbeda sehingga *rule of thumb* desain RSM memberikan 13 titik variasi interaksi antara 2 variabel yang diinput. RSM akan menjalankan

berbagai alur analisis statistik, sehingga akan didapatkan keadaan terhadap interaksi 2 variabel yang optimal.

Menurut Ratnawati *et al.* (2017), Penggunaan metode RSM pada perancangan formulasi yang telah ditentukan secara subjektif, bisa diketahui kondisi optimalnya secara langsung dengan syarat varibel faktor yang dilakukan pada penelitian lebih dari satu. Kondisi respon optimal ditentukan dengan cara memplotkan 2 faktor (Variabel bebas) dengan menggunakan software minitab. Berdasarkan gambar plot permukaan (*Surface plot*) dapat dilihat 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 Againa *et al.* (2016), berdasarkan data respon yang telah diperoleh dari penentuan perlakuan secara subjektif kemudian dimasukkan kedalam kolom *worksheet* dan dianalisis data *response surface*. Data optimasi bisa diketahui dari hasil penentuan 3 titik *residual plot*. Tiga titik tersebut meliputi, titik regular untuk *residual for plots*, *residual for fits* dan *residual versus order* yang muncul ketika respon telah dianalisis. Ketiga titik tersebut sebagai dasar pada perlakuan yang ditentukan secara subjektif oleh peneliti yang tanpa melalui tahapan proses perancangan formulasi untuk memunculkan titik tengahnya.

3.5.10 Asam Amino (SIG, 2012)

Dalam identifikasi komposisi asam amino oleh SIG (2012), menjelaskan bahwa dalam pengujian komposisi asam amino dilakukan dengan metode UPLC. Analisa asam amino dengan metode UPLC dilakukan di laboratorium Saraswanti Indo Genetech, Bogor. Langkah pertama yang dilakukan dengan metode UPLC adalah dengan mengambil 0,50 mL cairan sampel yang akan diuji. Kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 100 ml dan ditambahkan 2,0 mL larutan standar

internal AABA 10mM. Encerkan larutan sampai tanda batas dengan HCl 0,1N lalu dihomogenkan dengan cara dikocok. Selanjutnya saring larutan menggunakan membran filter 0,22 µm, kemudian diambil 10 µl larutan dan dimasukkan ke dalam insert vial. Ditambahkan AccQ-Fluor Borate sebanyak 70 µl lalu di-vortex. Setelah itu ditambahkan *reagent fluor A* sebanyak 20 µl kemudian di-vortex kembali dan diamkan selama 1 menit. Selanjutnya diinkubasi selama 10 menit pada suhu 55°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

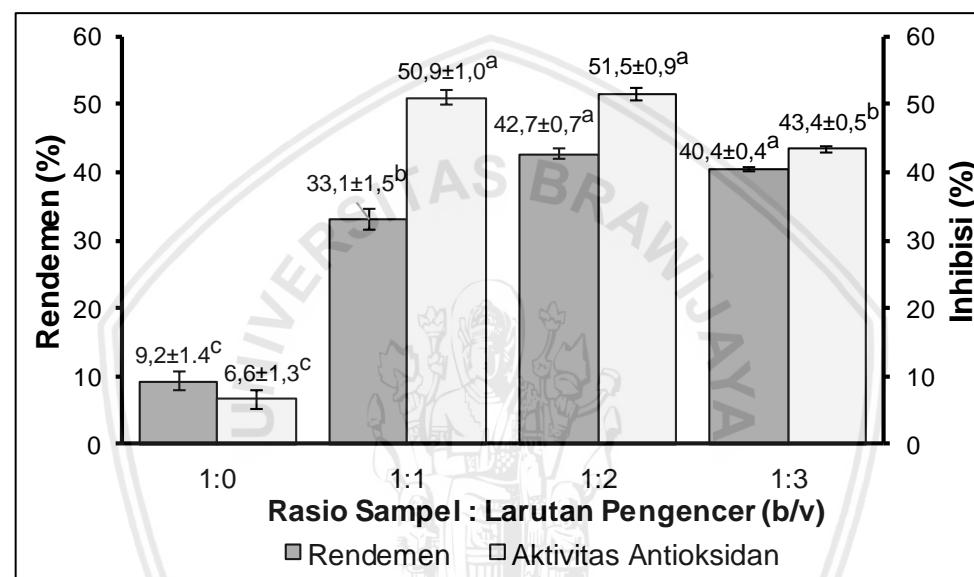
Pada penelitian pendahuluan, dilakukan proses pembuatan hidrolisat protein dari kepala ikan kakatua (*Chlorurus sordidus*) dengan rasio antara sampel dan larutan pengencer (b/v) yang berbeda yaitu 1:0; 1:1; 1:2 dan 1:3 dengan 3 kali ulangan. Setelah diperoleh hasil akhir berupa cairan hidrolisat protein, maka dilakukan perhitungan rendemen dan uji aktivitas antioksidan.

Rendemen HPI didapat dengan menghitung persentase banyaknya produk hidrolisat yang dihasilkan terhadap volume bahan baku sebelum dihidrolisis. Uji rendemen merupakan salah satu indikator untuk mengetahui efektif tidaknya metode yang diterapkan pada penelitian. Semakin tinggi nilai rendemen, maka semakin tinggi nilai ekonomisnya karena semakin tinggi jumlah yang dapat dimanfaatkan dari bahan tersebut (Anwar dan Rosmawati, 2013).

Uji aktivitas antioksidan pada HPI kepala ikan kakatua dilakukan dengan metode DPPH. Menurut Torino *et al.* (2012), aktivitas antioksidan pada hidrolisat protein sangat dipengaruhi oleh jenis peptida yang terbentuk selama fermentasi, pembentukan peptida ini dipengaruhi oleh aktivitas dan spesifitas protease bakteri yang berperan dalam fermentasi. Adanya aktivitas antioksidan pada sampel ditandai dengan perubahan warna dari ungu menjadi kuning.

Hasil perhitungan rendemen pada penelitian pendahuluan berkisar antara $9,2\pm1,4\%$ hingga $42,7\pm0,9\%$. Sedangkan hasil pengujian aktivitas antioksidan pada penelitian pendahuluan berkisar antara $6,6\pm1,3\%$ hingga $51,5\pm0,9\%$. Dari keseluruhan data rendemen dan aktivitas antioksidan tertinggi terdapat pada perlakuan rasio antara sampel dan larutan pengencer (b/v) 1:2 ($42,7\pm0,7\%$ dan $51,5\pm0,9\%$) sedangkan terendah pada perlakuan rasio antara sampel dan pengencer (b/v) 1:0 ($9,2\pm1,4\%$ dan $6,6\pm1,3\%$). Berdasarkan analisis keragaman

terhadap rendemen dan aktivitas antioksidan, dapat diketahui bahwa perlakuan rasio antara sampel dan larutan pengencer (b/v) yang berbeda memberikan hasil berbeda nyata ($P<0.05$). Sehingga adanya perbedaan rasio antara sampel dan larutan pengencer (b/v) memberikan pengaruh terhadap rendemen dan aktivitas antioksidan HPI kepala ikan kakatua pada penelitian pendahuluan. Hasil perhitungan rendemen dan aktivitas antioksidan pada penelitian pendahuluan disajikan pada Gambar 7.



Gambar 7. Rendemen dan Aktivitas Antioksidan Penelitian Pendahuluan HPI Kepala Ikan Kakatua

Berdasarkan Gambar 7, menunjukkan bahwa rasio antara sampel dan larutan pengencer (b/v) yang terbaik dalam pembuatan HPI kepala ikan kakatua adalah 1:2. Hal tersebut dikarenakan rasio 1:2 (b/v) menghasilkan HPI dengan rendemen dan aktivitas antioksidan tertinggi sebesar $42,7\pm0,7\%$ dan $51,5\pm0,9\%$. Rendemen HPI kepala ikan kakatua pada penelitian pendahuluan ini lebih tinggi jika dibandingkan dengan HPI limbah kepala ikan nila (10,11%) (Srikanya *et al.*, 2017) dan limbah kepala ikan tuna (9,85%) (Parvathy *et al.*, 2018), namun untuk aktivitas antioksidannya lebih rendah jika dibandingkan HPI limbah kepala ikan catla (77,92%) (Elavarasan *et al.*, 2014) pada rasio 1:2 (b/v).

Tingginya nilai rendemen HPI kepala ikan kakatua yang diperoleh dikarenakan perhitungannya berdasarkan hasil akhir fase cair protein terlarut yang belum melalui proses pemanasan. Menurut Cucikodana *et al.* (2012), pemanasan mengakibatkan pengeluaran cairan yang terikat dari suatu bahan. Hasil akhir pemanasan merupakan bahan yang bebas dari air (cairan) atau mengandung air dalam jumlah yang rendah.

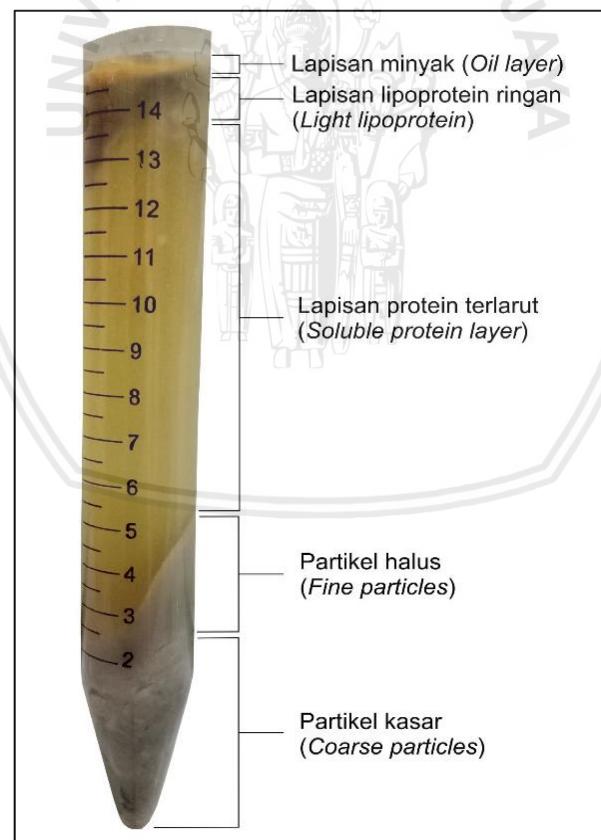
Meningkatnya penambahan rasio air terhadap substrat sebagai media selama hidrolisis pada pembuatan HPI mengakibatkan peningkatan pelarutan sampel sehingga akan ada perbedaan pada persentase rendemen (Sylla *et al.*, 2018). Rendemen dari HPI juga dipengaruhi oleh perbedaan spesies ikan, bagian ikan, jenis enzim yang digunakan, dan kondisi hidrolisis yang diterapkan (Jamil *et al.*, 2016). Selain itu rendemen yang terbentuk dari protein cair dihasilkan dari pelepasan air yang terperangkap di antara otot daging ikan, yang membawa protein sarkoplasma (Hultin dan Kelleher, 1999).

Semakin tinggi konsentrasi hidrolisat protein maka dapat meningkatkan nilai persen aktivitas antioksidannya. Hal ini disebabkan adanya peptida atau asam amino yang bersifat antioksidan. Hal tersebut membuat donor hidrogen dari peptida yang semakin banyak dan akan bereaksi dengan radikal DPPH kemudian membentuk DPPH yang non-radikal (Balada, 2018). Radikal DPPH yang mendapatkan donor elektron akan berubah menjadi bentuk dan tereduksi menjadi DPPH-H. Proses reduksi radikal DPPH menjadi DPPH-H ini ditandai dengan terjadinya perubahan warna dari ungu menjadi kuning pucat (Molyneux, 2004).

Perlakuan dengan hasil rendemen dan aktivitas antioksidan tertinggi pada penelitian pendahuluan ini (1:2) (b/v), akan menentukan rasio antara sampel dan larutan pengencer yang digunakan dalam pembuatan HPI kepala ikan kakatua pada penelitian utama.

4.2 Hidrolisat Protein Kepala Ikan Kakatua

HPI diperoleh dari pengambilan supernatan hasil sentrifugasi sampel yang telah mengalami proses hidrolisis. Menurut Wijayanti *et al.* (2016), sentrifugasi perlu dilakukan guna memisahkan partikel-partikel berdasarkan berat molekulnya yang tidak diinginkan sehingga didapatkan fraksi larutan berupa hidrolisat protein ikan. Menurut Nurdiani *et al.* (2015), lima lapisan yang terbentuk setelah sentrifugasi diantaranya lapisan minyak, lapisan lipoprotein, lapisan protein cair (terlarut) serta lapisan yang tidak larut meliputi lapisan partikel halus dan kasar yang ada di bagian bawah. Setiap lapisan akan dipisahkan terutama pada lapisan protein terlarut sebagai hasil hidrolisat protein fase cair. Hasil pemisahan sentrifuge HPI kepala ikan kakatua disajikan pada Gambar 8.



Gambar 8. Hasil Pemisahan Menggunakan Sentrifuge

Fraksi padat didapatkan dengan cara mengeringkan fraksi cair HPI kepala ikan kakatua menggunakan alat *spray dryer* sampai menghasilkan serbuk. Menurut Annisa *et al.* (2017), mesin *spray dryer* akan menyemprotkan sampel hidrolisat pada suhu tinggi sampai menghasilkan bubuk kering yang akan ditampung pada tabung mesin *spray dryer*. Pemanasan dengan suhu tinggi ini bertujuan untuk menguapkan kandungan air yang ada pada hidrolisat. Hasil dari fraksi cair dan serbuk HPI kepala ikan kakatua di sajikan pada Gambar 9.



Gambar 9. HPI Kepala Ikan Kakatua.

A= Fraksi Cair HPI; B= Serbuk HPI

Diketahui dari Gambar 9, bahwa HPI kepala ikan kakatua fase cair maupun padat (serbuk) berwarna kecoklatan. Timbulnya warna coklat diakibatkan oleh karakteristik dari bahan maupun adanya reaksi Maillard. Menurut Bernadeta *et al.* (2012), warna hidrolisat protein ikan ditentukan oleh pigmen/zat warna yang terdapat pada ikan yang digunakan sebagai bahan baku. Warna hidrolisat protein ikan juga dipengaruhi oleh reaksi pencoklatan non-enzimatis (reaksi Maillard) selama proses hidrolisis, yakni reaksi yang terjadi antara gugus hidroksil pada gula pereduksi dengan gugus amino dari asam amino atau protein.

Bau yang dihasilkan dari HPI kepala ikan kakatua cair maupun serbuk adalah sedikit amis. Bau amis diakibatkan oleh adanya oksidasi yang terjadi akibat

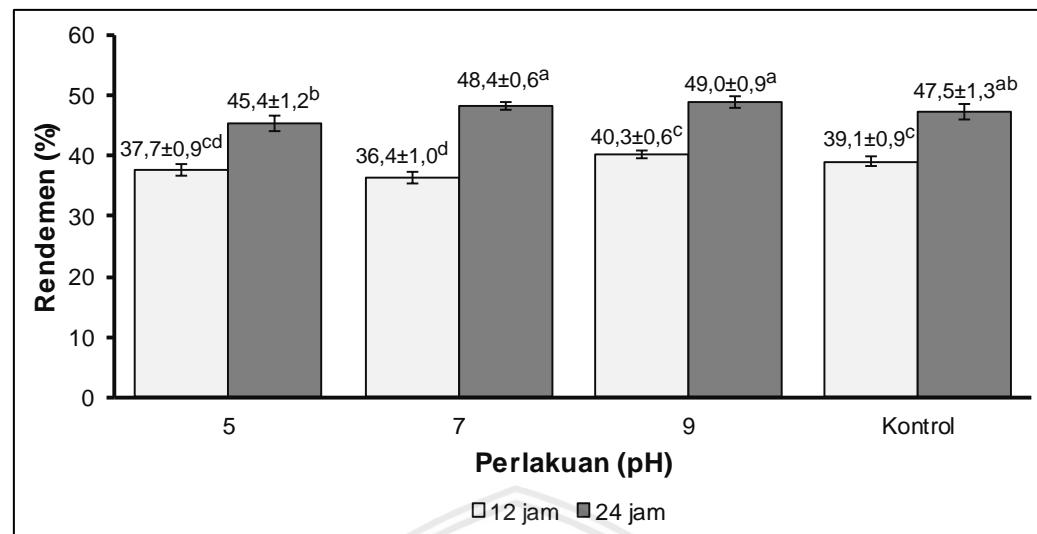
proses hidrolisis. Menurut Aubourg (2001), proses hidrolisis lemak memicu adanya oksidasi, sehingga menghasilkan komponen yang dapat menimbulkan bau amis pada hidrolisat. Pada reaksi hidrolisis, lemak akan diubah menjadi asam lemak bebas (ALB) dan gliserol. Pembentukan asam lemak bebas tidak mempengaruhi nilai gizi pada ikan, tetapi nilai asam lemak bebas tersebut dapat digunakan untuk mengetahui tingkat ketengikan produk.

4.3 Penelitian Utama

Pada penelitian utama, proses pembuatan hidrolisat protein dari kepala ikan kakatua (*Chlorurus sordidus*) dilakukan menggunakan rasio antara sampel dan larutan pengencer (b/v) adalah 1:2, dengan perlakuan pH hidrolisis (5, 7 dan 9) yang dibandingkan dengan perlakuan kontrol yaitu tanpa mengubah pH bahan (pH 6,4) pada lama hidrolisis (12 jam dan 24 jam) yang berbeda. Setelah diperoleh hidrolisat, lalu dilakukan analisa karakteristik yang meliputi rendemen, antioksidan, kadar protein, derajat hidrolisis (DH), berat molekul dan komposisi asam amino untuk fase cair. Kemudian dilanjutkan analisa kadar air, kadar abu dan kadar lemak untuk fase padat (serbuk).

4.3.1 Rendemen

Rendemen merupakan salah satu parameter penting dalam menentukan baik dan efisiennya perlakuan yang digunakan dalam proses pembuatan HPI kepala ikan kakatua. Rendemen HPI kepala ikan kakatua yang diperoleh merupakan jumlah (gram) hidrolisat fase cair yang didapat berbanding dengan jumlah sampel yang telah diencerkan sebelum dilakukan perlakuan inkubasi (Kurniawan, 2012). Rendemen HPI kepala ikan kakatua disajikan pada Gambar 10.



Gambar 10. Rendemen HPI Kepala Ikan Kakatua

Hasil penelitian menunjukkan bahwa rendemen HPI kepala ikan kakatua berkisar antara $36,4\pm1,0\%$ hingga $49,0\pm0,9\%$. Dari keseluruhan data rendemen HPI kepala ikan kakatua yang diperoleh, dapat diketahui bahwa rendemen tertinggi diperoleh pada pH 9 dengan lama hidrolisis 24 jam sebesar $49,0\pm0,9\%$, sedangkan rendemen terendah diperoleh pada pH 7 dengan lama hidrolisis 12 jam sebesar $36,4\pm1,0\%$. Berdasarkan analisis keragaman, dapat diketahui bahwa perlakuan pH, lama hidrolisis, dan interaksi keduanya memberikan hasil berbeda nyata ($P<0.05$). Sehingga adanya perlakuan pH dan lama hidrolisis memberikan pengaruh terhadap rendemen HPI kepala ikan kakatua. Analisis keragaman pengaruh pH dan lama hidrolisis terhadap rendemen HPI kepala ikan kakatua disajikan pada Lampiran 14.

Dari Gambar 10, dapat diketahui perlakuan yang optimal untuk parameter rendemen adalah pada pH 9 dengan lama hidrolisis 24 jam ($49,0\pm0,9\%$). Rendemen HPI kepala ikan kakatua lebih rendah jika dibandingkan dengan HPI limbah kepala ikan tuna (60,73%) (Ramakrishnan *et al.*, 2013) dan limbah ikan cod (75%) (Himonides *et al.*, 2011). Pada perlakuan pH 7 dengan lama hidrolisis 12 jam ($36,1\pm1\%$) dan 24 jam ($48,4\pm0,6\%$), didapatkan nilai rendemen yang berbeda

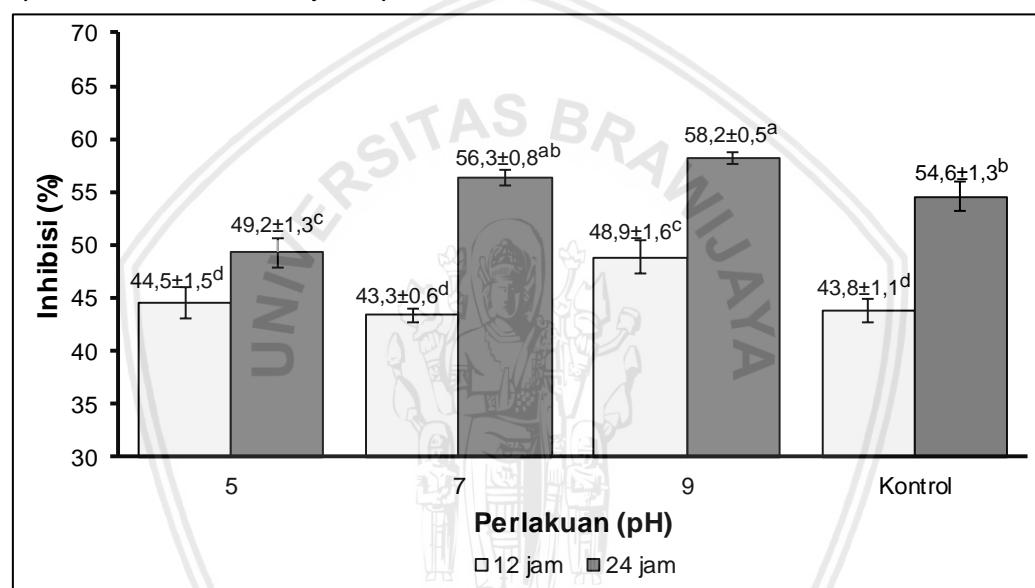
jika dibandingkan hasil dari penelitian pendahuluan dengan lama hidrolisis 18 jam ($42,7 \pm 0,7\%$). Rendemen HPI kepala ikan kakatua cenderung lebih tinggi pada lama hidrolisis 24 jam. Menurut Purbasari (2008), tinggi rendahnya rendemen suatu hidrolisat dipengaruhi oleh lama hidrolisis yang diterapkan. Rendemen hidrolisat akan meningkat seiring dengan bertambahnya waktu hidrolisis hingga mencapai keadaan stasioner. Besarnya nilai rendemen juga dipengaruhi oleh terlarutnya komponen gizi seperti lemak, protein, dan mineral selama proses hidrolisis (Shahidi *et al.*, 1995).

Pembuatan HPI kepala ikan kakatua didasari pada hidrolisis secara enzimatik oleh protease endogen yang ada pada bahan. Selama hidrolisis, protease menghidrolisis substrat dengan kecepatan tertentu. Nilai kecepatan hidrolisis dipengaruhi oleh konsentrasi substrat, konsentrasi enzim, nilai pH, serta suhu yang digunakan pada proses (Winarno, 1983). Diketahui bahwa pada pH 9 nilai rendemen HPI ikan kakatua memiliki kecenderungan yang lebih tinggi dibandingkan pada perlakuan pH lain. Menurut Ekantari *et al.* (2005), hidrolisis protein menggunakan enzim protease endogen memiliki kisaran pH optimum yang berbeda-beda. Menurut Kristjansson (1991), aktivitas protease limbah ikan sarden (pencernaan dan kepala) optimal pada pH 10 sedangkan pada ikan secara umum pada kisaran pH 7,5-8.

Penerapan pH juga berhubungan dengan titik isoelektrik protein (pI) pada bahan. Menurut Sudrajat *et al.* (2016), titik Isoelektrik protein (pI) adalah pH dimana protein memiliki jumlah muatan ion positif dan negatif yang sama. Tiap jenis protein mempunyai titik isoelektrik yang berbeda-beda. Pada titik isoelektriknya, kelarutan protein menjadi lebih rendah sehingga terjadi penggumpalan atau pengendapan. Dengan demikian penerapan pH diluar rentang titik isoelektrik (terutama pH 9) dapat meningkatkan protein terlarutnya (HPI).

4.3.2 Aktivitas Antioksidan

Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl* (DPPH). Parameter yang digunakan untuk menginterpretasikan hasil pengujian adalah persentase inhibisi atau penangkapan radikal bebas. Menurut Bisan *et al.* (2008), aktivitas penangkapan DPPH menunjukkan kemampuan senyawa antioksidan untuk mendonorkan hidrogen atau elektron, sehingga mengubah zat radikal menjadi lebih stabil. Aktivitas antioksidan HPI kepala ikan kakatua disajikan pada Gambar 11.



Gambar 11. Aktivitas Antioksidan HPI Kepala Ikan Kakatua

Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan HPI kepala ikan kakatua berkisar antara $43,4\pm0,6\%$ hingga $58,2\pm0,5\%$. Dari keseluruhan data aktivitas antioksidan HPI kepala ikan kakatua yang diperoleh, dapat diketahui bahwa aktivitas antioksidan tertinggi diperoleh pada pH 9 dengan lama hidrolisis 24 jam sebesar $58,2\pm0,5\%$, sedangkan aktivitas antioksidan terendah diperoleh pada pH 7 dengan lama hidrolisis 12 jam sebesar $43,4\pm0,6\%$. Berdasarkan analisis keragaman, dapat diketahui bahwa perlakuan pH, lama hidrolisis, dan interaksi keduanya memberikan hasil berbeda nyata ($P<0.05$). Sehingga adanya perlakuan pH dan lama hidrolisis memberikan pengaruh terhadap aktivitas

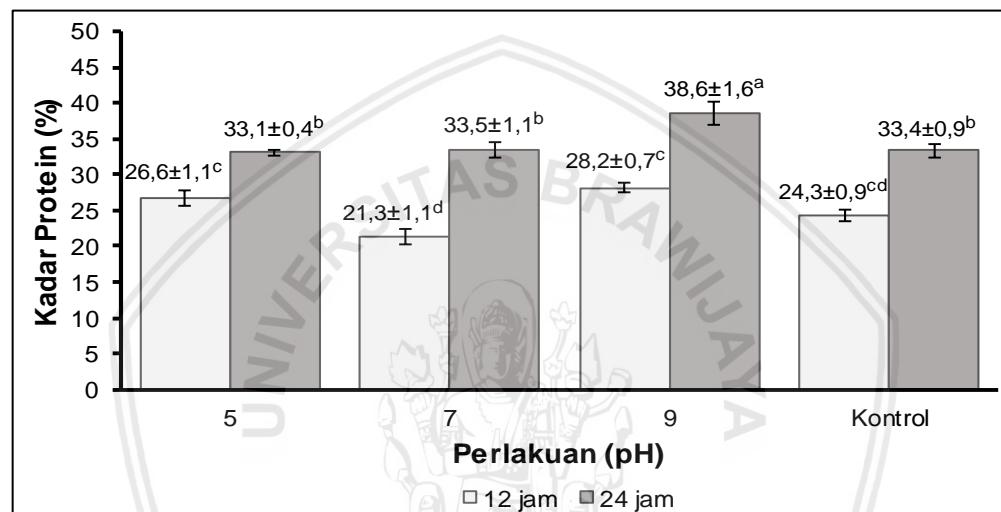
antioksidan HPI kepala ikan kakatua. Analisis keragaman pengaruh pH dan lama hidrolisis terhadap aktivitas antioksidan HPI kepala ikan kakatua disajikan pada Lampiran 15.

Dari Gambar 11, dapat diketahui aktivitas antioksidan yang paling optimal adalah perlakuan pH 9 dengan lama hidrolisis 24 jam ($58,2\pm0,5\%$). Aktivitas antioksidan HPI kepala ikan kakatua lebih rendah jika dibandingkan dengan HPI limbah kepala ikan lele ($66,8\pm0,4\%$) (Le Vo *et al.*, 2016) dan limbah kepala ikan makerel (74,7%) (Ediriweera *et al.*, 2019). Pada perlakuan pH 7 dengan lama hidrolisis 12 jam ($43,3\pm0,6\%$) dan 24 jam ($56,3\pm0,8\%$), didapatkan nilai aktivitas antioksidan yang berbeda jika dibandingkan hasil dari penelitian pendahuluan dengan lama hidrolisis 18 jam ($51,5\pm0,9\%$). Aktivitas antioksidan HPI kepala ikan kakatua cenderung lebih tinggi pada lama hidrolisis 24 jam. Menurut Wu *et al.* (2003), aktivitas antioksidan hidrolisat dipengaruhi oleh perubahan ukuran dan komposisi asam amino bebas serta peptida kecil akibat lamanya waktu hidrolisis. Peptida dianggap lebih potensial sebagai antioksidan dibandingkan dengan asam amino bebas karena stabilitasnya tidak menyebabkan reaksi oksidatif lebih lanjut (Elias *et al.*, 2008). Dapat diketahui bahwa pada pH 9 (basa) HPI kepala ikan kakatua memiliki karakteristik aktivitas antioksidan dengan keadaan protease endogen yang optimal. Menurut Amiza *et al.* (2013), protease endogen pada HPI limbah ikan patin merupakan jenis protease basa (pH 9,4) dengan hasil sifat aktivitas antioksidan dan pengelat logam tertinggi pada perlakuan.

Menurut Saiga *et al.* (2003), asam amino yang memiliki aktivitas antioksidan adalah jenis asam amino hidrofobik dan aromatik. Menurut Le Vo *et al.* (2016), kandungan asam amino hidrofobik pada hidrolisat seperti Pro, Leu, Ala, Trp dan Phe dapat meningkatkan nilai aktivitas antioksidan. Jenis asam amino Tyr, Met, His dan Lys juga memiliki aktivitas antioksidan dengan membuat molekul oksigen yang reaktif lebih stabil melalui transfer elektron atau proton.

4.3.3 Kadar Protein

Protein merupakan komponen yang penting dalam produk hidrolisat. Salah satu tujuan memproduksi HPI adalah untuk memenuhi kebutuhan protein hewani, khususnya dari hasil perikanan. Tingkat mutu dari produk hidrolisat sangat ditentukan oleh kadar zat terlarut, terutama kadar protein yang dihitung dengan kadar total nitrogen (Kurniawan *et al.*, 2012). Kadar protein HPI kepala ikan kakatua disajikan pada Gambar 12.



Gambar 12. Kadar Protein HPI Kepala Ikan Kakatua

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar protein HPI kepala ikan kakatua berkisar antara $21,3\pm1,1\%$ hingga $38,6\pm1,6\%$. Dari keseluruhan data kadar protein HPI kepala ikan kakatua yang diperoleh, dapat diketahui bahwa kadar protein tertinggi diperoleh pada pH 9 dengan lama hidrolisis 24 jam sebesar $38,6\pm1,6\%$, sedangkan kadar protein terendah diperoleh pada pH 7 dengan lama hidrolisis 12 jam sebesar $21,3\pm1,1\%$. Berdasarkan analisis keragaman, dapat diketahui bahwa perlakuan pH, lama hidrolisis, dan interaksi keduanya memberikan hasil berbeda nyata ($P<0.05$). Sehingga adanya perlakuan pH dan lama hidrolisis memberikan pengaruh terhadap kadar protein HPI kepala ikan kakatua. Analisis keragaman pengaruh pH dan lama hidrolisis terhadap kadar protein HPI kepala ikan kakatua disajikan pada Lampiran 16.

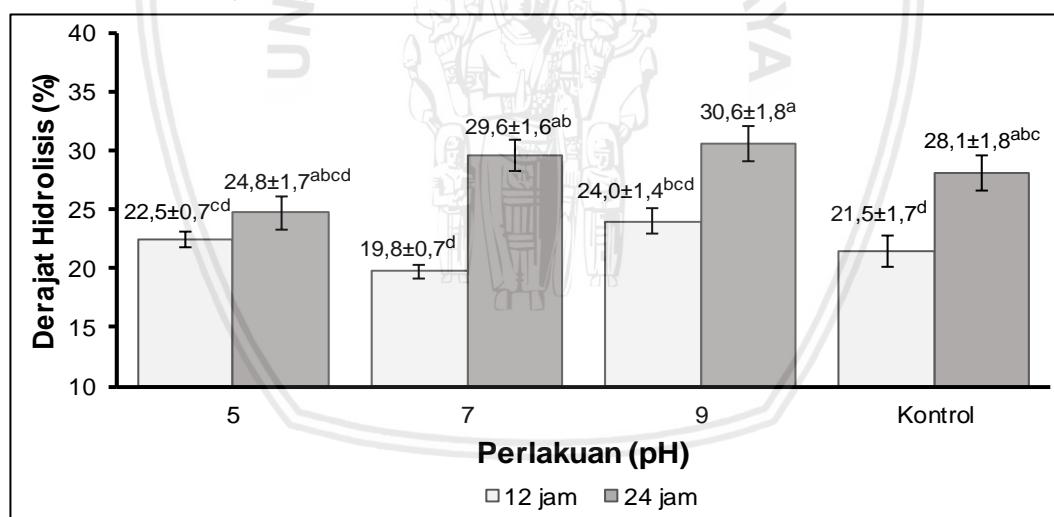
Dari Gambar 12, dapat diketahui kadar protein yang paling optimal adalah perlakuan pH 9 dengan lama hidrolisis 24 jam ($38,6 \pm 1,6\%$). Kadar protein HPI kepala ikan kakatua tidak jauh berbeda jika dibandingkan dengan HPI kepala ikan lele (39.03%) (Utomo *et al.*, 2014) dan lebih tinggi dari HPI kepala ikan tuna (28,39%) (Ramakrishnan *el al.*, 2013), namun masih lebih rendah dari standar HPI komersil (73-75%) (IQI, 2005). Menurut Nurhayati *et al.* (2013), tinggi atau rendahnya nilai protein yang terukur dapat dipengaruhi oleh besarnya kandungan air yang hilang (dehidrasi) dari bahan. Nilai protein yang terukur akan semakin besar jika jumlah air yang hilang semakin besar. Kadar protein HPI kepala ikan kakatua terjadi peningkatan seiring dengan bertambahnya waktu proses hidrolisis. Menurut Purbasari (2008), peningkatan kandungan protein hidrolisat disebabkan karena selama proses hidrolisis terjadi konversi protein yang bersifat tidak larut menjadi senyawa nitrogen yang bersifat larut. Kemudian protein akan terurai menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana seperti peptida dan asam amino.

Penerapan pada pH 9 cenderung menghasilkan HPI kepala ikan kakatua dengan kadar protein yang lebih tinggi. Menurut Triyono (2010), pengaruh pH didasarkan pada adanya perbedaan muatan dan membuat daya tarik menarik yang kuat antar protein yang sama terjadi pada pH isoelektrik. Pada pH diluar rentang titik isoelektrik protein, akan menyebabkan menurunnya daya tarik menarik antar molekul protein sehingga molekul lebih mudah terurai. Menurut Sudrajat *et al.* (2016), kelarutan protein dapat naik ketika pH menjadi basa. Keadaan larutan yang basa membuat ion-ion OH⁻ akan mengikat ion-ion H⁺ pada gugus-gugus amina (-NH3⁺). Terikatnya ion H⁺ gugus amina pada OH⁻ dari pelarut basa membuat protein membentuk ion negatif (-COO⁻). Semakin basa kondisi ekstraksi, maka semakin besar pula konsentrasi ion OH⁻ yang mampu mengikat ion H⁺ pada gugus -NH3⁺, sehingga kelarutan protein menjadi lebih tinggi.

Food and Agricultural Organization (2011) mendefinisikan tiga jenis konsentrat protein ikan. Jenis pertama yaitu tipe A (kadar protein lebih dari 80%), tipe B (kadar protein kurang dari 80%) dan tipe C (konsentrat yang dibuat tidak higienis). Sehingga berdasarkan kadar proteinnya, HPI kepala ikan kakatua tergolong hidrolisat tipe B.

4.3.4 Derajat Hidrolisis (DH)

Derajat hidrolisis (DH) merupakan suatu parameter yang menunjukkan kemampuan protease untuk menguraikan protein dengan cara membandingkan amino nitrogen dengan total nitrogen. DH digunakan untuk memantau reaksi hidrolisis, semakin tinggi derajat hidrolisis menunjukkan semakin efektif proses hidrolisis dalam memecah ikatan peptida (Nurilmala *et al.*, 2018). DH HPI kepala ikan kakatua disajikan pada Gambar 13.



Gambar 13. Derajat Hidrolisis HPI Kepala Ikan Kakatua

Hasil penelitian menunjukkan bahwa DH pada HPI kepala ikan kakatua berkisar antara $19,8\pm0,7\%$ hingga $30,6\pm1,8\%$. Dari keseluruhan data DH pada HPI kepala ikan kakatua yang diperoleh, dapat diketahui bahwa DH tertinggi diperoleh pada pH 9 dengan lama hidrolisis 24 jam sebesar $30,6\pm1,8\%$, sedangkan DH terendah diperoleh pada pH 7 dengan lama hidrolisis 12 jam sebesar $19,9\pm2,1\%$.

Berdasarkan analisis keragaman, dapat diketahui bahwa perlakuan pH, lama hidrolisis, dan interaksi keduanya memberikan hasil berbeda nyata ($P<0.05$). Sehingga adanya perlakuan pH dan lama hidrolisis memberikan pengaruh terhadap DH HPI kepala ikan kakatua. Analisis keragaman pengaruh pH dan lama hidrolisis terhadap DH HPI kepala ikan kakatua disajikan pada Lampiran 17.

Dari Gambar 13, dapat diketahui DH yang paling optimal adalah perlakuan pH 9 dengan lama hidrolisis 24 jam ($30,6\pm1,8\%$). DH HPI kepala ikan kakatua lebih tinggi jika dibandingkan dengan HPI kepala ikan nila (14,3%) (Srikanya *et al.*, 2017) dan limbah ikan kurisi (15%) (Gajanan *et al.*, 2016). Menurut Nurhayati *et al.* (2013), tingginya derajat hidrolisis disebabkan oleh peningkatan peptida dan asam amino yang terlarut dalam TCA akibat dari pemutusan ikatan peptida selama hidrolisis protein.

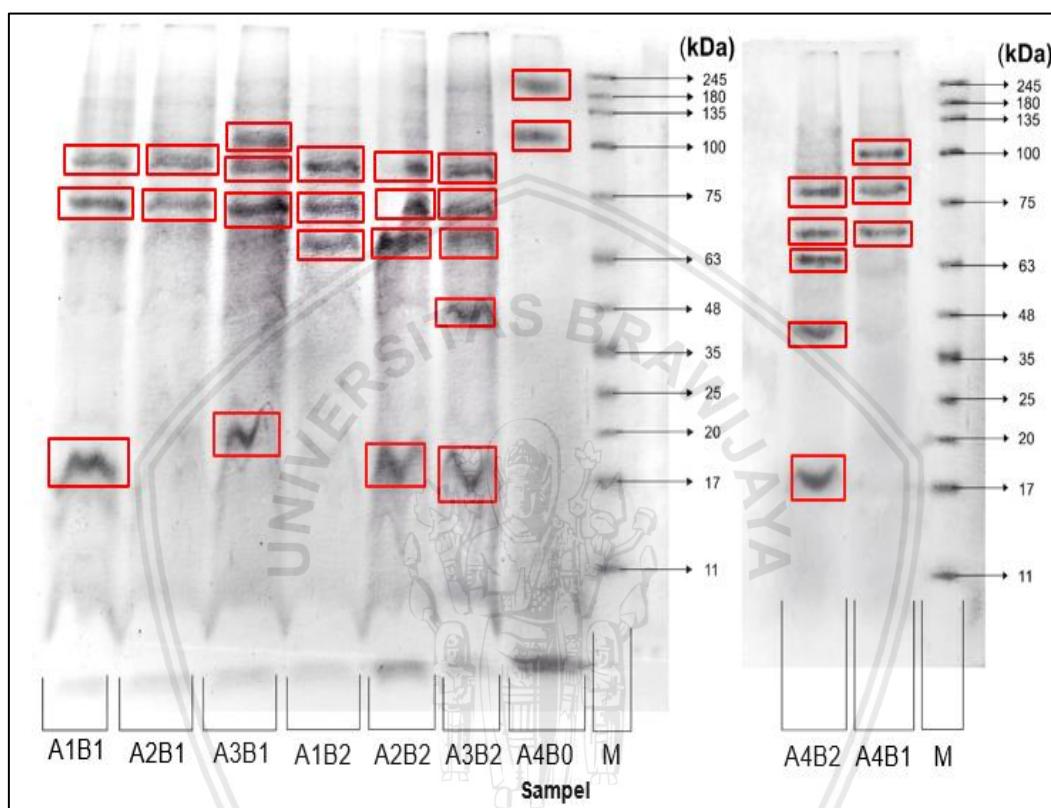
Derajat hidrolisis HPI kepala ikan kakatua meningkat seiring bertambahnya waktu hidrolisis. Menurut Balada (2018), lama waktu yang diterapkan dapat mempengaruhi derajat hidrolisis dikarenakan terjadinya hidrolisis lanjutan. Adanya waktu hidrolisis yang semakin panjang membuat peptida atau asam-asam amino hasil pemecahan protein akan dipecah lagi dan dimanfaatkan oleh BAL untuk pertumbuhannya.

4.3.5 Berat Molekul

Analisis berat molekul HPI dilakukan menggunakan metode *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamid Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE). SDS-PAGE merupakan teknik elektroforesis gel yang digunakan untuk memisahkan protein berdasarkan kemampuannya untuk bergerak dalam arus listrik (Karnia, 2018). Elektroforesis dapat memisahkan protein berdasarkan ukuran molekul dan interaksinya terhadap muatan listrik. Gel poliakrilamida merupakan penyanga pada proses elektroforesis sehingga pita protein lebih stabil. Gel poliakrilamida

terbentuk dari polimerisasi akrilamida dengan agen pembentuk ikatan silang bis-akrilamida dan ikatan silang dari polimer akrilamida menghasilkan pori dengan ukuran yang berbeda (Roy *et al.*, 2012). Hasil profil distribusi dan nilai pengukuran berat molekul HPI kepala ikan kakatua pada gel dapat dilihat pada Gambar 14 dan

Tabel 6.



Gambar 14. Profil Distribusi Berat Molekul HPI Kepala Ikan Kakatua pada Separating Gel

Tabel 6. Nilai Pengukuran Berat Molekul HPI Kepala Ikan Kakatua

No.	Sampel	Berat Molekul (BM)
1.	A1B1	19,71 kDa; 73,03 kDa dan 88,61 kDa
2.	A2B1	74,87 kDa dan 87,16 kDa
3.	A3B1	23,14 kDa; 74,05 kDa; 84,31 kDa dan 123,45 kDa
4.	A1B2	69,87 kDa; 73,43 kDa dan 86,68 kDa
5.	A2B2	20,49 kDa; 67,59 kDa; 72,23 dan 87,16 kDa
6.	A3B2	17,55 kDa; 46,68 kDa; 68,16 kDa; 73,03 kDa dan 85,72 kDa
7.	A4B0	130,47 kDa dan 174,86 kDa
8.	A4B1	64,39 kDa; 76,63 kDa dan 96,18 kDa
9.	A4B2	18,05 kDa; 41,67 kDa; 63,15 kDa; 65,64 kDa dan 75,89 kDa

Keterangan:

M = marker (protein standar)

A1B1 = pH 5 dengan lama hidrolisis 12 jam

A2B1 = pH 7 dengan lama hidrolisis 12 jam

- A3B1 = pH 9 dengan lama hidrolisis 12 jam
A1B2 = pH 5 dengan lama hidrolisis 24 jam
A2B2 = pH 7 dengan lama hidrolisis 24 jam
A3B2 = pH 9 dengan lama hidrolisis 24 jam
A4B0 = kontrol (pH 6,4) tanpa hidrolisis (0 jam)
A4B1 = kontrol (pH 6,4) dengan lama hidrolisis 12 jam
A4B2 = kontrol (pH 6,4) dengan lama hidrolisis 24 jam

Berdasarkan Tabel 6, berat molekul HPI kepala ikan kakatua berkisar antara 17,55 kDa hingga 123,45 kDa lebih rendah dari perlakuan tanpa hidrolisis (A4B0) (130,47 kDa dan 174,86 kDa). Dari keseluruhan data berat molekul HPI kepala ikan kakatua, dapat diketahui bahwa berat molekul terendah diperoleh pada perlakuan pH 9 dengan lama hidrolisis 24 jam (A3B2) (17,55 kDa hingga 85,72 kDa) dengan hasil sifat aktivitas antioksidan yang paling tinggi ($58,2 \pm 0,5\%$). Berat molekul HPI kepala ikan kakatua lebih tinggi jika dibandingkan dengan HPI kepala ikan nila (14,4 hingga 116 kDa) (Tejpal *et al.*, 2017). Menurut Karnia (2018), berat molekul hidrolisat yang rendah menunjukkan proses hidrolisis yang terjadi bekerja secara efektif, yaitu dengan adanya pemecahan ikatan peptida (myosin, actin, troponin dan tropomyosin) oleh protease endogen maupun enzim.

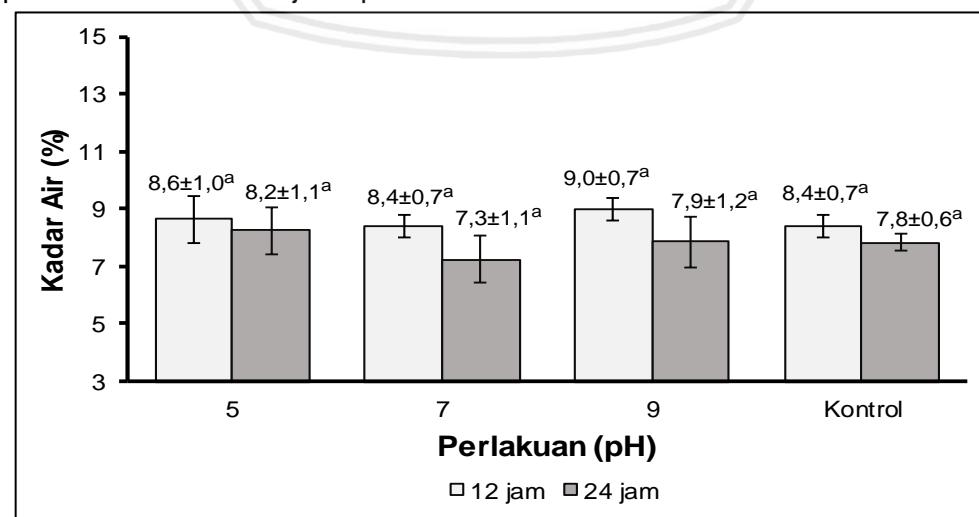
Hidrolisat protein yang mengandung peptida dengan rantai pendek memiliki berbagai manfaat sebagai pangan fungsional, *nutraceutical* dan *pharmaceutical*. Menurut Li *et al.* (2018), peptida dalam hidrolisat dengan berat molekul yang lebih rendah berpotensi memiliki sifat bioaktif seperti antioksidan, imunomodulator, antimikroba dan antihipertensi pada kisaran berat molekul rendah yaitu 10-20 kDa. Peptida hasil hidrolisis menunjukkan aktivitas antioksidan dan emulsifikasi yang berbeda-beda tergantung dari masing-masing komposisi asam amino (kehadiran asam amino yang terlibat dalam reaksi oksidatif) serta ukuran dan berat molekul suatu peptida (Mutamimah, 2018).

Menurut Guillen *et al.* (2010), berat molekul berpengaruh terhadap sifat fungsional hidrolisat seperti aktivitas antioksidan dan pengemulsi. Dalam penelitiannya, HPI kulit cumi dengan bobot molekul 52-84 kDa memiliki aktivitas

antioksidan dan tingkat emulsifikasi yang lebih rendah. Selain itu berat molekul juga mempengaruhi karakteristik viskositas HPI. Menurut Annisa *et al.* (2017), berat molekul protein berhubungan langsung dengan panjang rantai peptidanya. Semakin pendek ukuran peptida suatu protein, maka berat molekulnya semakin rendah dan distribusi molekul dalam larutan akan semakin mudah sehingga menghasilkan viskositas yang rendah. Data perhitungan berat molekul HPI kepala ikan kakatua dapat dilihat pada Lampiran 18.

4.3.6 Kadar Air

Air merupakan salah satu kandungan yang penting dari suatu bahan pangan. Air dalam bahan makanan dapat menentukan *acceptability*, kesegaran, daya tahan, penampakan, tekstur, cita rasa, serta mutu bahan pangan (Lombu *et al.*, 2015). 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). Sampel kadar air diperoleh dengan mengeringkan fraksi dari HPI menggunakan *spray dryer* sehingga menghasilkan bubuk. Kadar air serbuk HPI kepala ikan kakatua disajikan pada Gambar 15.



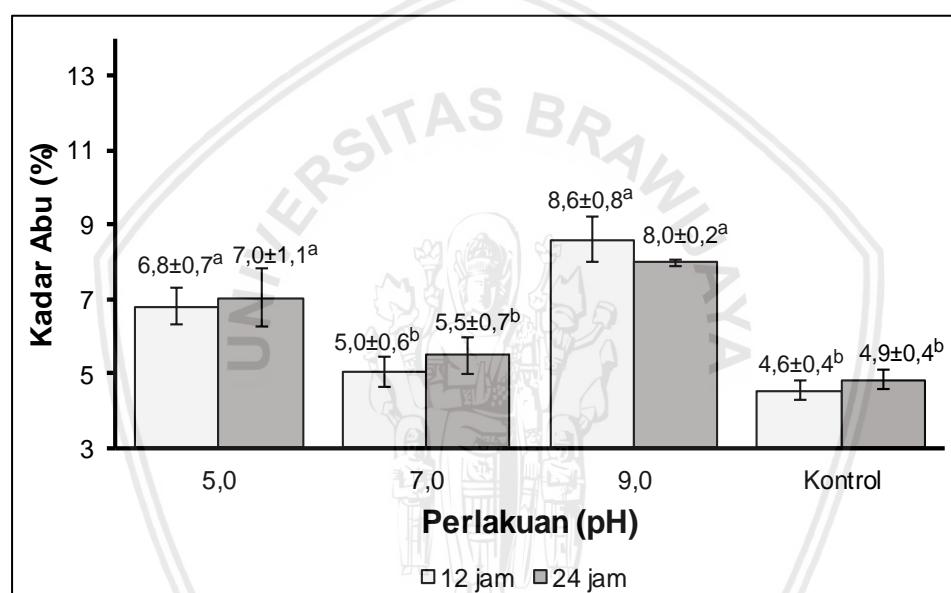
Gambar 15. Kadar Air Serbuk HPI Kepala Ikan Kakatua

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar air serbuk HPI kepala ikan kakatua berkisar antara $7,3\pm1,1\%$ hingga $9,0\pm0,7\%$. Dari keseluruhan data kadar air serbuk HPI kepala ikan kakatua yang diperoleh, dapat diketahui bahwa kadar air tertinggi diperoleh pada pH 9 dengan lama hidrolisis 12 jam sebesar $9,0\pm0,7\%$, sedangkan kadar air terendah diperoleh pada pH 7 dengan lama hidrolisis 24 jam sebesar $7,3\pm1,1\%$. Berdasarkan analisis keragaman, dapat diketahui bahwa perlakuan pH, lama hidrolisis, dan interaksi keduanya memberikan hasil tidak berbeda nyata ($P>0.05$). Sehingga adanya perlakuan pH dan lama hidrolisis tidak memberikan pengaruh terhadap kadar air serbuk HPI kepala ikan kakatua. Analisis keragaman pengaruh pH dan lama hidrolisis terhadap kadar air HPI kepala ikan kakatua disajikan pada Lampiran 19.

Dari Gambar 15, dapat diketahui kadar air yang paling optimal adalah perlakuan pH 7 dengan lama hidrolisis 24 jam ($7,3\pm1,1\%$). Kadar air serbuk HPI kepala ikan kakatua lebih tinggi jika dibandingkan dengan HPI limbah kepala ikan cod (5%) (Himonides *et al.*, 2011) dan standar HPI komersil (3-5%) (IQI, 2005). Kadar air pada serbuk HPI dipengaruhi oleh jenis metode pengeringan yang digunakan. Menurut Chalamaiah *et al.* (2012), kadar air yang rendah dari HPI dapat dikaitkan dengan jenis sampel dan suhu tinggi yang digunakan selama proses penguapan saat *spray drying*. Menurut Annisa *et al.* (2017), kadar air yang dihasilkan dari proses pengeringan dengan metode *spray drying* dipengaruhi oleh suhu *inlet* dan *outlet* yang digunakan. Sedangkan pengeringan HPI menggunakan *freeze drying* dapat mencapai kadar air yang sangat rendah dengan resiko kerusakan protein yang kecil dikarenakan proses pengeringannya terjadi pada suhu rendah.

4.3.7 Kadar Abu

Abu adalah zat anorganik yang tidak ikut terbakar dalam proses pembakaran zat organik. Zat tersebut adalah kalsium, kalium, natrium, besi, magnesium dan mangan (Desrosier, 1988). Kadar abu dapat digunakan untuk menentukan total mineral dalam bahan karena pada tahap pengabuan akan terjadi proses pembakaran dan oksidasi komponen organik bahan pangan dan menyisakan residu anorganik seperti mineral (Mardiyah, 2017). Kadar abu serbuk HPI kepala ikan kakatua disajikan pada Gambar 16.



Gambar 16. Kadar Abu Serbuk HPI Kepala Ikan Kakatua

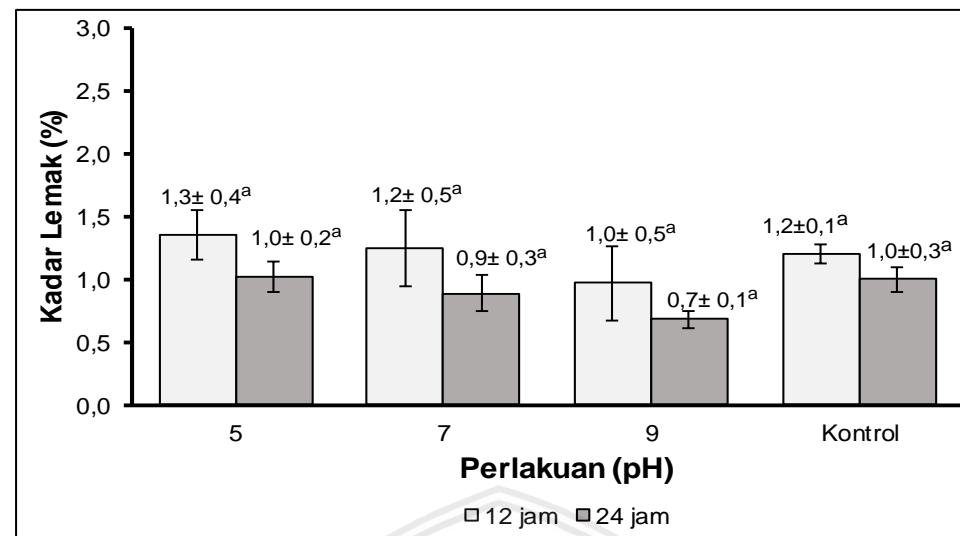
Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar abu serbuk HPI kepala ikan kakatua berkisar antara $4,6\pm0,4\%$ hingga $8,6\pm0,8\%$. Dari keseluruhan data kadar abu serbuk HPI kepala ikan kakatua yang diperoleh, dapat diketahui bahwa kadar abu tertinggi diperoleh pada pH 9 dengan lama hidrolisis 12 jam sebesar $8,6\pm0,8\%$, sedangkan kadar abu terendah diperoleh pada perlakuan kontrol (pH 6,4) dengan lama hidrolisis 12 jam sebesar $4,6\pm0,4\%$. Berdasarkan analisis keragaman, dapat diketahui bahwa perlakuan pH memberikan hasil berbeda nyata ($P<0,05$), sedangkan perlakuan lama hidrolisis, dan interaksi keduanya memberikan hasil tidak berbeda nyata ($P>0,05$). Sehingga hanya perlakuan pH yang memberikan

pengaruh terhadap kadar abu serbuk HPI kepala ikan kakatua. Analisis keragaman pengaruh pH dan lama hidrolisis terhadap kadar abu HPI kepala ikan kakatua disajikan pada Lampiran 20.

Dari Gambar 16, dapat diketahui kadar abu yang paling optimal adalah perlakuan kontrol (pH 6,4) dengan lama hidrolisis 12 jam ($4,6\pm0,4\%$). Kadar abu serbuk HPI kepala ikan kakatua lebih tinggi jika dibandingkan dengan HPI limbah kepala ikan *cod* (1%) (Himonides *et al.*, 2011) namun masih memenuhi standar HPI komersil (4-7%) (IQI, 2005) selain perlakuan pada pH 9. Kadar abu HPI kepala ikan kakatua cenderung meningkat seiring bertambahnya jumlah buffer (HCl dan NaOH) yang diberikan. Menurut Salamah *et al.* (2011), kadar abu yang tinggi pada HPI disebabkan oleh penambahan senyawa alkali misalnya NaOH atau senyawa asam misalnya HCl, dalam proses hidrolisis protein. Pencampuran senyawa asam dan alkali dalam larutan hidrolisat protein akan menyebabkan terbentuknya senyawa garam sehingga dapat meningkatkan kadar abu pada hidrolisat protein.

4.3.8 Kadar Lemak

Kadar lemak dalam suatu bahan pangan mempengaruhi perubahan mutu produk selama penyimpanan. Menurut Nurhayati *et al.* (2013), produk HPI dengan kadar lemak rendah umumnya lebih stabil dan tahan lama jika dibandingkan dengan produk hidrolisat yang mempunyai kadar lemak tinggi. Tingginya kadar lemak meningkatkan kemungkinan terjadinya proses oksidasi yang membuat produk HPI berbau busuk dan memiliki rasa yang tengik, hal ini disebut dengan proses ketengikan. Penentuan kadar lemak HPI kepala ikan kakatua menggunakan metode soxhlet. Kadar lemak serbuk HPI kepala ikan kakatua disajikan pada Gambar 17.



Gambar 17. Kadar Lemak Serbuk HPI Kepala Ikan Kakatua

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar lemak serbuk HPI kepala ikan kakatua berkisar antara $0,7\pm0,1\%$ hingga $1,3\pm0,4\%$. Dari keseluruhan data kadar lemak serbuk HPI kepala ikan kakatua yang diperoleh, dapat diketahui bahwa kadar lemak tertinggi diperoleh pada pH 5 dengan lama hidrolisis 12 jam sebesar $1,3\pm0,4\%$, sedangkan kadar lemak terendah diperoleh pada pH 9 dengan lama hidrolisis 24 jam sebesar $0,7\pm0,1\%$. Berdasarkan analisis keragaman, dapat diketahui bahwa perlakuan pH, lama hidrolisis, dan interaksi keduanya memberikan hasil yang tidak berbeda nyata ($P>0.05$). Sehingga adanya perlakuan pH dan lama hidrolisis tidak memberikan pengaruh terhadap kadar lemak serbuk HPI kepala ikan kakatua. Analisis keragaman pengaruh pH dan lama hidrolisis terhadap kadar lemak serbuk HPI kepala ikan kakatua disajikan pada Lampiran 21.

Dari Gambar 17, dapat diketahui kadar lemak yang paling optimal adalah perlakuan pH 9 dengan lama hidrolisis 24 jam ($0,7\pm0,1\%$). Kadar lemak serbuk HPI kepala ikan kakatua lebih rendah jika dibandingkan dengan HPI limbah kepala ikan *croaker* ($5,1\pm4,0\%$) (Amorim *et al.*, 2016) dan standar HPI komersil (19-22%) (IQI, 2005). Rendahnya kadar lemak serbuk HPI kepala ikan kakatua dikarenakan

rendahnya kandungan lemak pada bahan baku kepala ikan (3,92%). Menurut Annisa *et al.* (2017), kandungan lemak dalam produk hidrolisat dipengaruhi oleh karakteristik bahan baku yang digunakan serta proses pemisahan lemak setelah hidrolisis. Kandungan lemak pada hidrolisat setelah hidrolisis sebagian ikut terpisah bersama protein yang tidak terlarut, yaitu ketika proses sentrifugasi.

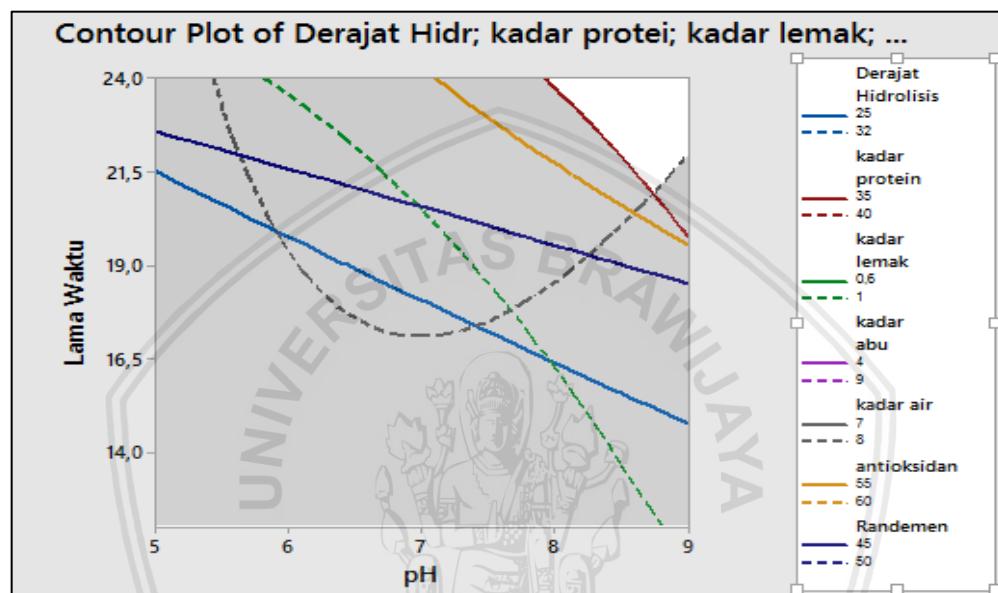
Menurut Purbasari (2008), penurunan kadar lemak pada HPI juga disebabkan adanya proses hidrolisis enzimatis, sehingga terjadi perubahan struktur jaringan yang sangat cepat. Pengamatan dengan mikroskop elektron terhadap bagian tipis dari otot ikan memperlihatkan bahwa protein miofibril banyak berkurang selama proses hidrolisis, tapi membran sel otot terlihat relatif resisten dari kerusakan. Saat proses hidrolisis, membran ini cenderung berkumpul dan membentuk gelembung yang tidak larut, mengakibatkan hilangnya membran lipid.

4.4 Perlakuan Terbaik Hidrolisat Protein Kepala Ikan Kakatua

Penentuan perlakuan terbaik dilakukan dengan mengetahui kondisi optimum dari perlakuan yang masih diterima respon dengan menggunakan *Response Surface Methodology* (RSM). Menurut Aritonang (2014), RSM merupakan kumpulan teknik matematika dan statistika yang digunakan untuk menganalisa permasalahan pada respon yang dipengaruhi oleh beberapa variabel faktor sehingga diperoleh hasil berupa nilai optimasi respon. Dalam penelitian ini, interaksi antara faktor 1 (pH) dan faktor 2 (lama hidrolisis) mempengaruhi respon dari setiap karakteristik HPI kepala ikan kakatua yang diujikan.

Menurut Ratnawati *et al.* (2017), kelebihan metode RSM jika dibandingkan dengan pendekatan satu variabel dimana titik respon analis tidak mendeteksi frekuensi interaksi antara dua atau lebih faktor, sehingga metode ini merupakan metode yang dapat dipilih untuk mengetahui kondisi optimal yang dipengaruhi oleh interaksi antar variabel. Penentuan perlakuan subjektif yang dapat diterima oleh

respon dilihat dari terbentuknya area putih pada *overlaid contour plot*, yaitu hasil interaksi karakteristik HPI yang diuji (rendemen, antioksidan, kadar air, kadar abu, kadar lemak, kadar protein dan DH). Menurut Trihaditia (2016), penentuan daerah optimasi dengan metode RSM dapat menggunakan grafik secara *contour* dan *surface*. Grafik *Overlaid Contour Plot* HPI kepala ikan kakatua disajikan pada Gambar 18.



Gambar 18. Overlaid Contour Plot Karakteristik HPI Kepala Ikan Kakatua

Dari Gambar 18, diketahui perlakuan yang dapat diterima oleh respon adalah pada area putih, yaitu pada kisaran pH= 8-9 dan lama hidrolisis 21,5-24 jam. Prediksi nilai optimasi *response surface*, menunjukkan perlakuan yang optimal dari pembuatan HPI kepala ikan kakatua adalah pada pH 9 dengan lama hidrolisis 24 jam, dikarenakan nilai *desirability*-nya yang paling tinggi (0,85251). Menurut Nurmiah *et al.* (2013), nilai *desirability* yang semakin mendekati nilai 1,0 menunjukkan kemampuan program untuk menghasilkan produk yang dikehendaki semakin sempurna. Tujuan optimasi bukan untuk memperoleh nilai *desirability* 1,0, namun untuk mencari kondisi terbaik yang mempertemukan semua fungsi tujuan. Grafik nilai optimasi HPI kepala ikan kakatua dapat dilihat pada Lampiran 22. Hasil perlakuan terbaik disajikan pada Tabel 7.

Tabel 7. Hasil Perlakuan Terbaik Hidrolisat Protein Kepala Ikan Kakatua

No.	Parameter	pH 9 selama 24 jam
1.	Rendemen	49 %
2.	Aktivitas Antioksidan	58,2 %
3.	Kadar Air	7,85 %
4.	Kadar Abu	8,00 %
5.	Kadar Lemak	0,68 %
6.	Kadar Protein	38,59 %
7.	Derajat Hidrolisis (DH)	30,65 %
8.	Berat Molekul	17,55-87,16 kDa

Berdasarkan Tabel 7, dapat diketahui bahwa karakteristik hidrolisat protein kepala ikan kakatua akan semakin baik pada pH dan lama hidrolisis yang optimal yaitu pada pH 9 selama 24 jam, dan akan semakin menurun kualitasnya pada pH dan lama hidrolisis yang lebih rendah. Menurut Purbasari (2008), kondisi yang perlu diperhatikan selama hidrolisis berlangsung selain suhu dan nilai pH adalah waktu hidrolisis. Menurut Bower *et al.* (2009), hidrolisis yang terjadi juga tergantung pada kondisi optimal dari jenis protease endogen. Seperti halnya aktivitas serin protease, tripsin dan kemotripsin di saluran pencernaan ikan kakap dan tongkol yang optimal pada pH 9 dengan suhu 45°C dan 55°C (Singh dan Soottawat, 2018).

Data Keseluruhan dari pengujian karakteristik HPI kepala ikan kakatua pada perlakuan pH (5, 7, 9 dan kontrol) dengan lama hidrolisis (12 jam dan 24 jam) yang berbeda disajikan pada Lampiran 23. HPI kepala ikan kakatua pada penelitian ini belum memenuhi standar jika dibandingkan dengan standar produk HPI komersil (IQI, 2005) dan HPI untuk *Flavour Enhancer* (Thaddee dan Lyraz, 1990), dikarenakan kandungan proteininya yang tergolong masih rendah.

4.5 Komposisi Asam Amino Hidrolisat Protein Kepala Ikan Kakatua

Asam amino merupakan komponen penyusun protein yang dihubungkan oleh ikatan peptida. Analisis asam amino bertujuan untuk mengetahui jenis dan jumlah asam amino yang terkandung dalam protein bahan pangan (Kurniawan *et*

al., 2012). Asam amino juga dapat menentukan kualitas dari HPI yang telah dibuat, yaitu dari perbandingan asam amino yang terkandung dalam protein tersebut (Nurilmala *et al.*, 2018).

Berdasarkan nilai optimasi dari keseluruhan hasil penelitian, diketahui bahwa HPI pada perlakuan pH 9 dengan lama hidrolisis 24 jam merupakan hasil terbaik. Hasil perlakuan HPI kepala ikan kakatua terbaik kemudian dilanjutkan dengan identifikasi komposisi asam amino. Hasil komposisi asam amino HPI kepala ikan kakatua pada pH 9 dengan lama hidrolisis 24 jam dibandingkan dengan HPI kepala ikan tuna (Bougatef *et al.*, 2012) dan HPI komersil (IQI, 2015) disajikan pada Tabel 8.

Tabel 8. Komposisi Asam Amino Hidrolisat Protein Kepala Ikan Kakatua

No.	Asam Amino	HPI Kepala Ikan Kakatua (%)	HPI Kepala Ikan Tuna (%)	HPI Komersil (%)
1.	L-Serin	1,81	5,18	4,9
2.	L-Asam glutamat	14,43	11,2	14
3.	L-Fenilalanin	5,53	6,18	3,7
4.	L-Isoleusin	4,34	4,83	4
5.	L-Valin	5,38	7,49	4,9
6.	L-Alanin	7,41	2,88	7,3
7.	L-Arginin	6,12	11,53	6,8
8.	Glisin	7,63	3,32	11
9.	L-Lisin	8,30	10,23	7,5
10.	L-Asam Aspartat	11,06	9,91	9,5
11.	L-Leusin	8,48	6,48	6,5
12.	L-Prolin	5,64	3,62	-
13.	L-Tirosin	4,22	5,44	2,9
14.	L-Threonin	6,80	2,17	4,4
15.	L-Histidin	2,85	9,52	2,6
Total Asam Amino Esensial		41,69	46,9	42,7
Total Asam Amino Hidrofobik		41	36,92	29,30

Berdasarkan Tabel 8, hasil pengujian asam amino pada penelitian HPI ini yang menggunakan metode UPLC menampilkan 15 macam asam amino. Asam amino yang terkandung dalam HPI kepala ikan kakatua terdiri dari asam amino esensial dan asam amino non esensial. Asam amino esensial meliputi histidin, threonin, valin, isoleusin, leusin, fenilalanin, dan lisin. Sedangkan asam amino non esensial dapat meliputi asam aspartat, asam glutamat, serin, argin, glisin, alanin,

tirosin dan prolin. Menurut Jacoeb *et al.* (2012), asam amino esensial tidak dapat diproduksi dalam tubuh sehingga harus ditambahkan dalam bentuk makanan, sedangkan asam amino non esensial dapat diproduksi oleh tubuh.

Total asam amino esensial HPI kepala ikan kakatua (41,69%) mendekati standar HPI komersil (42,7%) (IQI, 2005), namun masih lebih rendah dibandingkan dengan HPI kepala ikan tuna (46,9%) (Bougatef *et al.*, 2012). Menurut Chobert *et al.* (1998), kandungan asam amino esensial dapat menunjukkan potensi hidrolisat sebagai sumber nutrisi yang bermanfaat. Perbedaan dalam komposisi asam amino antara hidrolisat tergantung pada perbedaan dalam spesifikasiitas enzim dan kondisi hidrolisis.

Total asam amino hidrofobik HPI kepala ikan kakatua (41%) lebih tinggi jika dibandingkan dengan HPI kepala ikan tuna (36,92%) (Bougatef *et al.*, 2012) dan HPI komersil (29,30%) (IQI, 2005). Komposisi asam amino juga dapat mempengaruhi sifat fungsional dari HPI, seperti sifat aktivitas antioksidan. Menurut Zainol *et al.* (2003), asam amino hidrofobik (alanin, leusin, dan prolin) terbukti memiliki aktivitas penangkapan radikal bebas. Asam amino hidrofobik aromatik (tirosin dan fenilalanin) juga dapat bersifat antioksidan dengan cara mendonorkan elektronnya. Menurut Rajapakse *et al.* (2005), asam amino aromatik umumnya dianggap sebagai agen pemulung, karena mereka menyumbangkan proton dengan mudah ke radikal yang kekurangan elektron. Pada saat yang sama, stabilitas antioksidan mereka tetap melalui struktur resonansi.

Perbedaan kandungan asam amino yang dimiliki oleh HPI kepala ikan kakatua, kepala ikan tuna dan HPI komersil disebabkan oleh perbedaan bahan bakunya. Menurut Annisa *et al.* (2017), asam amino pada setiap spesies ikan berbeda-beda tergantung faktor internal dan eksternal. Faktor internal berupa spesies ikan, jenis kelamin, umur, dan fase reproduksi pada ikan. Sedangkan faktor eksternal berupa faktor yang ada pada lingkungan hidup ikan.

5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh mengenai pengaruh penggunaan pH dan lama hidrolisis yang berbeda terhadap karakteristik hidrolisat protein dari kepala ikan kakatua (*Chlorurus sordidus*), diperoleh kesimpulan sebagai berikut:

- Pembuatan HPI kepala ikan kakatua (*Chlorurus sordidus*) menggunakan pH dan lama hidrolisis yang berbeda memberikan pengaruh terhadap karakteristik HPI kecuali pada kadar air dan kadar lemak dengan hasil terbaik pada perlakuan pH 9 dengan lama hidrolisis 24 jam. Karakteristik pada perlakuan terbaik meliputi rendemen 49%, aktivitas antioksidan 58,2%, kadar air 7,85%, kadar abu 8%, kadar lemak 0,68%, kadar protein 38,59%, DH 30,65%, serta berat molekulnya 17,55 kDa sampai 85,72 kDa dengan kandungan total asam amino esensial sebesar 41,69% dan total asam amino hidrofobik sebesar 41%.

5.2 Saran

Saran yang dapat diberikan pada penelitian ini yaitu perlu adanya penambahan range pH serta lama hidrolisis guna mengetahui secara spesifik pH optimum dan mulainya waktu stasioner dalam pembuatan hidrolisat protein dari kepala ikan kakatua. Kemudian diperlukan pengujian asam amino secara kualitatif guna mengetahui keseluruhan kandungan asam amino pada sampel hidrolisat protein dari kepala ikan kakatua.

DAFTAR PUSTAKA

- Adrim, Mohammad. 2010. Aspek biologi ikan kakatua (suku scaridae). *Oseana*. **33** (1): 41-50.
- Againa, D. Dioputri., S. Wirnani dan E. Supartini. 2016. Penerapan metode overlaid contour plot dan desirability function pada central composite design. *BIAStatistics*. **10** (1): 17-30.
- Alamsyah, A. S., La Sara, dan A. Mustofa. 2013. Studi biologi reproduksi ikan-ikan kakatua (*Scarus sp*) pada musim tangkap. *Jurnal Mina Laut Indonesia*. Hlm:73-83.
- Amiza, M. A., Ow, Y. W dan Faazaz, A. L. 2013. Physicochemical properties of silver catfish (*Pangasius sp*) frame hydrolysate. *International Food Research Journal*. **20** (3): 1255-1262.
- Amorim, R. G. Oliveira., F. C. Deschamps dan M. L. Pessatti. 2016. Protein hydrolysate waste of whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) as a way of adding value to fish and reducing the environmental liabilities of the fishing industry. *Journal of Aquatic Research*. **44** (5): 967-974.
- Anggreini, B. Andita., R. Karnila dan Edison. 2014. Pengaruh penambahan enzim papain berbeda terhadap presipitat dan supernatan hidrolisat protein ikan tongkol (*Euthynnus affinis*). Fakultas Perikanan. Universitas Riau.
- Annisa, Strata., Y. S. Darmanto dan U. Amalia. 2017. Pengaruh perbedaan spesies ikan terhadap hidrolisat protein ikan dengan penambahan enzim papain. *Jurnal Saintek Perikanan*. **13** (1): 24-30.
- Anwar, L. O. dan Rosmawati. 2013. Karakteristik hidrolisat protein tambelo (*Bactrnochophorus sp.*) yang dihidrolisis menggunakan enzim papain. *Biogenesis*. **1** (2) :133-140.
- AOAC. 2005. *Official Methods Of Analysis*. Washington D.C.: Association of Official Analytical Chemists.
- Arikunto, S. 2006. *Prosedur Penelitian Suatu Pendekatan Praktek*, Jakarta: Rineka Cipta.
- Aritonang, A. L. Pardamean. 2014. Analisis Metode Response Surface Pada Produksi Biodiesel Secara Katalitik Dengan Static Mixing Reactor. [Skripsi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Aubourg, S. 2001. Fluorescence study of the prooxidant activity of free fatty acid on marine lipids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **81**: 385-390.
- Balada. 2018. Aktivitas Antioksidan Hidrolisat Protein Daging Ikan Kuniran Hasil Fermentasi *Lactobacillus plantarum* SK(5). [Skripsi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.

- Beaufort, L.F. 1940. *The Fishes of the Indo-Australian Archipelago*. E.J. Brill, Leiden: 508.
- Benhabiles, M. S., Abdi, N., Drouiche, N., Lounici, H., Pauss, A., Goosen, M. F. A dan Mamen, N. 2012. Fish protein hydrolysate production from sardine solid waste by crude pepsin enzymatic hydrolysis in a bioreactor coupled to an ultrafiltration unit. *Materials Science and Engineering*. **32** (4): 928.
- Bernadeta., P. Ardiningsih dan I. H. Silalahi. 2012. Penentuan kondisi optimum hidrolisat protein dari limbah ikan ekor kuning (*Caesio cuning*) berdasarkan karakteristik organoleptik. *JKK*. **1** (1): 26-30.
- Bhaskar, N., Modi, V. K., Govindaraju, K., Radha, C dan Lalitha, R. G. (2007). Utilization of meat industry by products: protein hydrolysate from sheep visceral mass. *Bioresource Technology*. **98** (2): 388-394.
- Binsan W, Soottawat B, Wonnop V, Hideki K. 2008. Antioxidative activity of Mungoong, an extract paste, from the cephalothorax of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of Food Chemistry*. **106** (1): 185-193.
- Bougatef, Ali., R. Balti., A. Haddar., K. Jellouli., N. Souissi dan M. Nasri. 2012. Protein hydrolysates from bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) heads as influenced by the extent of enzymatic hydrolysis. *Journal Biotechnology and Bioprocess Engineering*. **17**: 841-852.
- Bower, Cindy., C. Malemute dan P. Bechtel. 2011. Endogenous protease activity in by-products of pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*). *Journal of Food Biochemistry*. **35**: 628–637.
- Chalamaiah M, Kumar B. D., Hemalatha R dan Jyothirmayi. 2012. Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. *Food Chemistry (Birch ed.)*. **135** (4): 3020–3038.
- Chamcheun, Chalinee. 2015. Production of fish protein hydrolysates by acid and enzymatic hydrolysis. *Journal of Medical and Bioengineering*. **4** (6): 466-470
- Chen, L.S. 2002. Post-settlement diet shift of *Chlorurus sordidus* and *Scarus schlegeli* (Pisces: Scaridae). *Zool. Stud.* **41**: 47-58.
- Choat, H. 1966. Parrot fish. *Australian Natural History*. **5** (8): 265-269.
- Chobert, J. M., C. B. Harb dan M. G. Nicolas. 1988. Solubility and emulsifying properties of caseins and whey proteins modified enzymatically by trypsin. *J. Agric. Food Chem.* **36**: 883-892.
- Cilbiz N dan Hanol Z. 2015. Evaluation of fisheries wastes as protein hydrolysate. *Journal of Survey in Fisheries Sciences*. **2** (1): 21-30.
- Cucikodana, Y, A. Supriadi, dan B. Purwanto. 2012. Pengaruh perbedaan suhu perebusan dan konsentrasi NaOH terhadap kualitas bubuk tulang ikan gabus (*Channa striata*). *Fishtech*. **1** (1): 91-101.

- Dewi, N. M. 2016. Peptida Antioksidatif Dari Hidrolisat Protein Ikan Kayu. [Skripsi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Dissanayake, M. dan Vasiljevic, T. 2009. Functional properties of whey proteins affected by heat treatment and hydrodynamic highpressure shearing. *Journal of Dairy Science*. **92**: 1387–1397.
- Donkor, O. N., Stojanovska, L., Ginn, P., Ashton, J. dan Vasiljevic, T. 2012. Germinated grains - sources of bioactive compounds. *Food Chemistry*. **135** (3): 950-959.
- Ediriweera, T. K., A. L. Y. H. Aruppala dan Abeyrathne. 2019. Analysis of bioactive properties of fish protein hydrolysates from *Scomber japonicus* fin wastes. *Journal of Technology and Value Addition*. **1** (1): 31-45.
- Efendi, D. Tiyas., E.Sutrisno dan W. D. Nugraha. 2016. Studi pemanfaatan limbah fleshing ikan menjadi kompos dengan menggunakan ulat kandang. *Jurnal Teknik Lingkungan*. **5** (2): 1-5.
- Ekantari, N., U. Santoso dan S. Hadiwiyoto. 2005. Optimasi Pembuatan Hidrolisat protein dari daging cicut (*Carcharhinus sp.*) menggunakan viscera dan tripsin. *Agrosains*. **18** (3): 327-341
- Elavarasan, V., N. Kumar dan B.A. Shamasundar. 2017. Antioxidant and functional properties of fish protein hydrolysates from fresh water carp (*catla catla*) as influenced by the nature of enzyme. *Journal of Food Processing and Preservation*. **38**: 207–1214.
- Elias, R. J., Kellerby S. S dan Decker E. A. 2008. Antioxidant activity of proteins and peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **48** (5): 430–441.
- Fathony, A. 2014. Pengaruh Volume Molase Rebus dan Lama Fermentasi yang Berbeda dengan Starter Khamir Laut Terhadap Kualitas Hidrolisat Protein Kepala Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*). [Skripsi]. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Brawijaya: Malang.
- Fernandes, Pedro. 2016. Enzymes in fish and seafood processing. *Bioengineering and Biotechnology*. **4**: 59.
- Food and Agriculture Organitation [FAO]. 2001. The living marine resources of the western central pacific, volume 6 Bony part 4 (Labridae to Latimeriidae), estuarine crocodiles, sea turtles, sea snakes and marine mammals. FAO. Rome, Italy. 3468.
- Food and Agriculture Organitation [FAO]. 2011. Fish Protein Concentrate. <http://www.fao.org/>. Diakses pada tanggal 23 April 2019.
- Food and Agriculture Organitation [FAO]. 2015. Fishery and Aquaculture Country Profiles Barbados. <http://www.fao.org/fishery/facp/BRB/en>. Diakses pada tanggal 26 Januari 2019.
- Gajanan, P. Girija., K. Elavarasan dan B. A. Shamasundar. 2016. Bioactive and functional properties of protein hydrolysates from fish frame processing waste using plant proteases. *Environ Sci Pollut Res*. Hlm: 1-11.

- Gbogouri, G.A., Linder, M., Fanni, J dan Parmentier, M. 2004. Influence of hydrolysis degree on the functional properties of salmon byproducts hydrolysates. *Journal of Food Science*. **69**: 615–622.
- Gesualdo A. M. L. dan Li-Chan E. C. Y. 1999. Functional properties of fish protein hydrolisate from herring (*Clupea harengus*). *Journal of Food Science*. **64** (6): 1000-1004.
- Guillen, Gomez, M. C., L. Caballero M. E., Montero M. P., Gimenez B. , Aleman A dan Lopez de Lacey A. 2010. Antioxidant and antimicrobial peptide fractions from squid and tuna skin gelatin. *Trivandrum*. **37** (2): 90-115.
- Hadiwiyoto, S. 1983. *Hasil-Hasil Olahan Susu, Daging, Ikan Dan Telur*. Yogyakarta: Liberty.
- Hanafiah,K. A. 2016. *Rancangan Percobaan Teori dan Aplikasi*, Edisi Ketiga. Jakarta: Raja Grafindo Persada. hlm 9-10.
- Hapsari, N dan Welasi, T. 2013. Pemanfaatan limbah ikan menjadi pupuk organik. *Jurnal Teknik Lingkungan*. **2** (1): 1-6.
- Haslina. 2004. Nilai Gizi, Daya Cerna Protein dan Daya Terima Patilo sebagai Makanan Jajanan yang Diperkaya dengan Hidrolisat Protein Ikan Mujair (*Oreochromis mossambicus*). Tesis. Universitas Diponegoro. Semarang.
- Himonides, Aristotelis T., Anthony K. D., Taylor dan A. J. Morris. 2011. Enzymatic hydrolysis of fish frames using pilot plant scale systems. *Journal Food and Nutrition Sciences*. **2**: 586-593.
- Hoyle, N. T dan Merritt, J. H. 1994. Quality of fish-protein hyrdolysates from herring (*Clupea harengus*). *Journal of Food Science*. **59** (1): 76-79.
- Hultin, H.O. dan Kelleher, S.D. 1999. Process for isolating a protein composition from a muscle source and protein composition: Google Patents.
- Indrawaty T. 1983. *Pembuatan Kecap Keong Sawah dengan Menggunakan Enzim Bromelin*. Jakarta: Balai Pustaka.
- Indriani, F., Sutrisno, E. dan Sumiyati, S. 2013. Studi pengaruh penambahan limbah ikan pada proses pembuatan pupuk cair dari urin sapi terhadap kandungan unsur hara makro (CNPK). *Jurnal Teknik Lingkungan*. **2** (2): 1-16.
- International Quality Ingredients [IQI]. 2005. Fish protein hydrolysate. <http://www.eyequye.nl>. Diakses pada tanggal 26 Januari 2019.
- Irianto, HE, Dewi, AS dan Giyatmi. 2014. Prospective Utilization of Fishery By-products in Indonesia', in S-K Kim. Seafood Processing By-Products. Springer New York. hlm: 21-34.
- Jacoeb, A. M., Nurjanah dan L. A. B. Lingga. 2012. Karakterisasi protein dan asam amino daging rajungan (*Portunus pelagicus*) akibat pengukusan. *JPHPI*. **15** (2): 156-163.
- 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.
- Jeevitha K., M. Priya K., dan S. S. Khora. 2014. Antioxidant activity of fish protein hydrolysates from *Sardinella longiceps*. *Int. J. Drug Dev. & Res.* **6** (4): 137-145.
- Jemil I., Jridi M., Nasri R., Ktari N., Salem R. B., Mehiri M., Hajji M dan Nasri M. 2014. Functional, antioxidant and antibacterial properties of protein hydrolysates prepared from fish meat fermented by *Bacillus subtilis* A26. *Process Biochemistry*. **49** (6): 963-972.
- Johnson, A.H. dan M.S. Peterson. 1974. *Encyclopedia of Food Technology*. Vol. II. The AVI Publisher Inc.: Connecticut.
- Karnia, Euis. 2018. Ekstraksi, Hidrolisis, Dan Fraksinasi Gelatin Kulit Ikan Tuna Sirip Kuning (*Thunnus albacares*). [Skripsi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Kefas, M., Michael, K.G., Abubakar, K.A, Edward, A. dan Wahide, J.A. 2014. Proximate and mineral contents of flesh and body parts of *Oreochromis niloticus* and *Synodontis clarias* in Mubi, Nigeria. *Global Journal of Biology, Agriculture and Health Sciences*. **3** (3): 116-121.
- Kirk, R. E. dan Othmer D. F. 1953. *Encyclopedia of Chemical Technology*. New York: The Interscience Publ. Inc. **11**.
- Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D dan Shahidi, F. 2007. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food Chemistry*. **102**: 1317–1327.
- Kristinsson, H. G dan Rasco B. A. 2000. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **40** (1): 43-81.
- Kristjansson, M. M. 1991. Purification and characterization of trypsin from pyloric caeca of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). *Jurnal Agric Food Chem*. **39**: 1736-1742.
- Kumalaningsih,S. 2012. *Metodologi Penelitian: Kupas Tuntas Cara Mencapai Tujuan*. Malang: UB press. 162 hlm.
- Kurniawan., S. Lestari dan S. Hanggita R.J. 2012. Hidrolisis protein tinta cumi-cumi (*Loligo sp*) dengan enzim papain. *Jurnal Fish Tech Unsri*. **1** (1): 41-54.
- Le Vo, T. Dinh., T. T. H. Nguyen., D. V. Phan., H. D. M. Nguyen dan H. Q. Tran. 2016. Investigation of antioxidant activity of the hydrolysate derived from Tra catfish byproducts using Alcalase 2.4 L FG for application as a natural antioxidant ingredient. *Journal Science and Technology Development*. **19** (6): 109-121.
- Lepongbulan, Winda., V. M. A. Tiwow dan A. W. M. Diah. 2017. Analisis unsur hara pupuk organik cair dari limbah ikan mujair (*Oreochromis mosambicus*)

- danau lindu dengan variasi volume mikroorganisme lokal (mol) bonggol pisang. *Jurnal Akademika Kimia.* **6** (2): 92-97.
- Lestari, D.P., Bambang, A.N., 2017. Analisis faktor-faktor yang mempengaruhi harga ikan kakatua (*Scarus sp*) di Pulau Panggang, Kepulauan Seribu, DKI Jakarta. *Journal of Fisheries Resources Utilization Management and Technology.* **6** (4): 215-223.
- Li, X., Ling W., Chunxiao Z dan Xiangli Y. 2018. Effects of supplementing low-molecular-weight fish hydrolysate in high soybean meal diets on growth, antioxidant activity and non-specific immune response of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences.* **18**: 717-727.
- Liu, C., Morioka, K., Itoh, Y dan Obatake, A. 2000. Contribution of lipid oxidation to bitterness and loss of free amino acids in the autolytic extract from fish wastes : Effective utilization of fish wastes. April 1999. hlm: 343–348.
- Lombu, V. Farah, A.T. Agustin, E.V. Pandey. 2015. Pemberian konsentrasi asam asetat pada mutu gelatin kulit ikan tuna. *Jurnal Media Teknologi Hasil Perikanan* **2** (3).
- Masuda, H.; K. Amaoka; C. Araga; T. Uyeno dan T. Yoshino. 1984. *The Fishes of the Japanese Archipelago*. Text. Tokyo: Tokai Univ. Press: 437.
- Melianawati Regina dan Retno Andamari. 2009. Hubungan panjang bobot, pertumbuhan, dan faktor kodisi ikan kakap merah (*Lutjanus argentimaculatus*) dari hasil budidaya. *Jurnal Riset Akuakultur.* **4** (2): 169-178.
- 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.
- Molyneux, P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazil (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Journal Science Technolgy.* **26** (2): 211-219.
- Mutamimah, Dewi., B. Ibrahim dan W. Trilaksani. 2018. Antioxidant activity of protein hydrolysate produced from tuna eye (*Thunnus sp.*) by enzymatic hydrolysis. *JPHPI.* **21** (3): 522-531.
- Nazir. 2014. *Metode Penelitian*. Bogor: Ghalia Indonesia.
- Nesse, K. Olav., A.P. Nagalakshmi., P. Marimuthu dan R. R. Simon. 2014. Safety evaluation of fish protein hydrolysate supplementation in malnourished children. *Regulatory Toxicology and Pharmacology.* **69**: 1–6.
- Nurdiani, R., Dissanayake, M., Street, W. E., Donkor, O.N., Singh, T. K dan Vasiljevic, T. 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): 2042-2053.
- Nurdiani, Rahmi., M. Dissanayake., W. E. Street., O. N. Donkor., Tanj K. Singh dan T. Vasiljevic. 2015. Sustainable use of marine resources – turning

- waste into food ingredients. *International Journal of Food Science and Technology.* **50**: 2329–2339.
- Nurhayati, Tati., Nurjanah dan C. H. Sanapi. 2013. Karakterisasi hidrolisat protein ikan lele dumbo (*Clarias gariepinus*). *JPHPI*. **16** (3): 207-214.
- Nurilmala, Mala., T. Nurhayati dan R. Roskananda. 2018. Limbah industri filet ikan patin untuk hidrolisat protein. *JPHPI*. **21** (2): 287-294.
- Nurmiah, Sitti., R. Syarief., Sukarno, R. Peranginangin, dan B. Nurtama. 2013. Aplikasi *response surface methodology* pada optimalisasi kondisi proses pengolahan alkali treated *cottonii* (ATC). *JPB Kelautan dan Perikanan*. **1** (8): 9–22.
- Parenti, P. dan J.E. Randall. 2000. An annotated checklist of the species of the Labroid fish families Labridae and Scaridae. *Ichthyological Bulletin*. **68**: 1-97.
- Parvathy, U., K. M. Nizam., A. A. Zynudheen., G. Ninan., S. K. Panda dan C. N. Ravishankar. 2018. Characterization of fish protein hydrolysate from red meat of *Euthynnus affinis* and its application as an antioxidant in iced sardine. *Journal of Scientific and Industrial Research*. **77**: 111-119.
- Pasupuleti V. K. dan Demain A. L. 2010. Protein hydrolysates in biotechnology. Inggris (GB): Springer Publishing. hlm: 3-5.
- Pasupuleti, V. K dan Braun, S. 2010. State of the Art Manufacturing of Protein Hydrolysates. Edisi 1.
- Patel, S. R. Jeshbhai. 2009. Optimisation for production of fish protein hydrolysate from Nile Perch (*Lates niloticus*) by-products. [Tesis]. University of Nairobi
- Purbasari, D. 2008. Produksi dan Karakteristik Hidrolisat Protein dari Kerang Mas Ngur (*A. striata*). [Skripsi]. Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Rahaningmas, J. Mose dan Ali Mansyur. 2018. Pengaruh perbedaan jenis umpan terhadap hasil tangkapan ikan kakatua (famili: scaridae) menggunakan pancing ulur. *Jurnal Sumberdaya Akuatik Indopasifik*. **2** (1): 25-34.
- Rahaningmas, J.Mose, Puspito, G., Diniah., Wahju, R.I. 2014. Efektivitas penangkapan layur (*Trichiurus sp*) menggunakan umpan buatan. *Jurnal Teknologi Perikanan dan Kelautan*. **5** (1): 33-40.
- Rajapakse, N., E. Mendis., H. G. Byun dan S. K. Kim. 2005. Purification and in vitro antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems. *J. Nutr. Biochem*.**16**: 562-569.
- Ramakrishnan, V. V., Ghaly., Brooks M.S dan Budge. 2013. Extraction of proteins from mackerel fish processing waste using alcalase enzyme. *Journal of Bioprocessing and Biotechniques*. **3** (2): 1-9.
- Reed, G. 1975. *Enzymes in Food Processing*. New York: Academic Press.
- Rehm HJ, Reed G. 1995. *Biotechnology: Enzymes, Biomass, Food and Feed*. New York: VCH.

- Roy, V. K., Kumar N. S. dan Gurusubramanian G. 2012. Protein-structure, properties and their separation by SDS-polyacrilamide gel electrophoresis. *Science Vision*. **12** (4): 170-181.
- Rustad, T., Storrø, I. and Slizyte, R. 2011. Possibilities for the utilisation of marine by products. *International Journal of Food Science and Technology*. **46** (10): 2001-2014.
- Ruthu, Murthy P.S., Rai A. K dan Bhaskar N. 2012. Fermentative recovery of lipids and proteins from freshwater fish head waste with reference to antimicrobial and antioxidant properties of protein hydrolysate. *Journal Food Science and Technology*. **51** (9): 1-9.
- Sabtecha, B., J.Jayapriya dan A.Tamilselvi. 2014. Extraction and characterization of proteolytic enzymes from fish visceral waste: Potential applications as destainer and dehairing agent. *International Journal of ChemTech Research*. **6** (10): 4504-4510.
- Saiga, A., Tanabe S dan Nishimura T. 2003. Antioxidant activity of peptides obtainaed from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. **51** (12): 3661-3667.
- Salamah E, Nurhayati T, Widadi IR. 2011. Pembuatan dan karakterisasi hidrolisat protein dari ikan lele dumbo (*Clarias gariepinus*) menggunakan enzim papain. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. **15** (1): 9-16.
- Sale PF. 2002. Coral reef fishes: Dynamics and diversity in a complex ecosystem. ISBN: 0-12-615185-7. San Diego: Academic Press.
- Sanmartín, E., Arboleya, J. C., Villamiel, M dan Moreno, FJ. 2009. Recent advances in the recovery and improvement of functional proteins from fish processing by-products: use of protein glycation as an alternative method. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. **8** (4): 332-344.
- Sari, M.I. 2004. *Enzim*. Fakultas Kedokteran. Universitas Sumatera Utara.
- Schimidi, M.K., Taylor, S.L dan Nordlee, J.A., 1994, *Use of Hydrolisate-Based Products in Special Medical Diets*, J. of Food Technology. hlm: 77-85.
- Setiawati, 2009. Analisis Sifat Fisik, Kimia Dan Fungsional Gelatin Yang Diekstrak Dari Kulit Dan Tulang Pari. [Skripsi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Shahidi, F., Han dan Synowiecki, J. 1995. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). *Food Chemistry*. **53**: 285–293.
- Singh, Avtar and S. Benjakul. 2018. Proteolysis and its control using protease inhibitors in fish and fish products. *Comprehensive Reviewsin Food Science and Food Safety*. **17**: 496-509.
- 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.
- Srikanya, A., K. Dhanapal., K. Sravani., K. Madhavi dan G. P. Kumar. 2017. A study on optimization of fish protein hydrolysate preparation by enzymatic

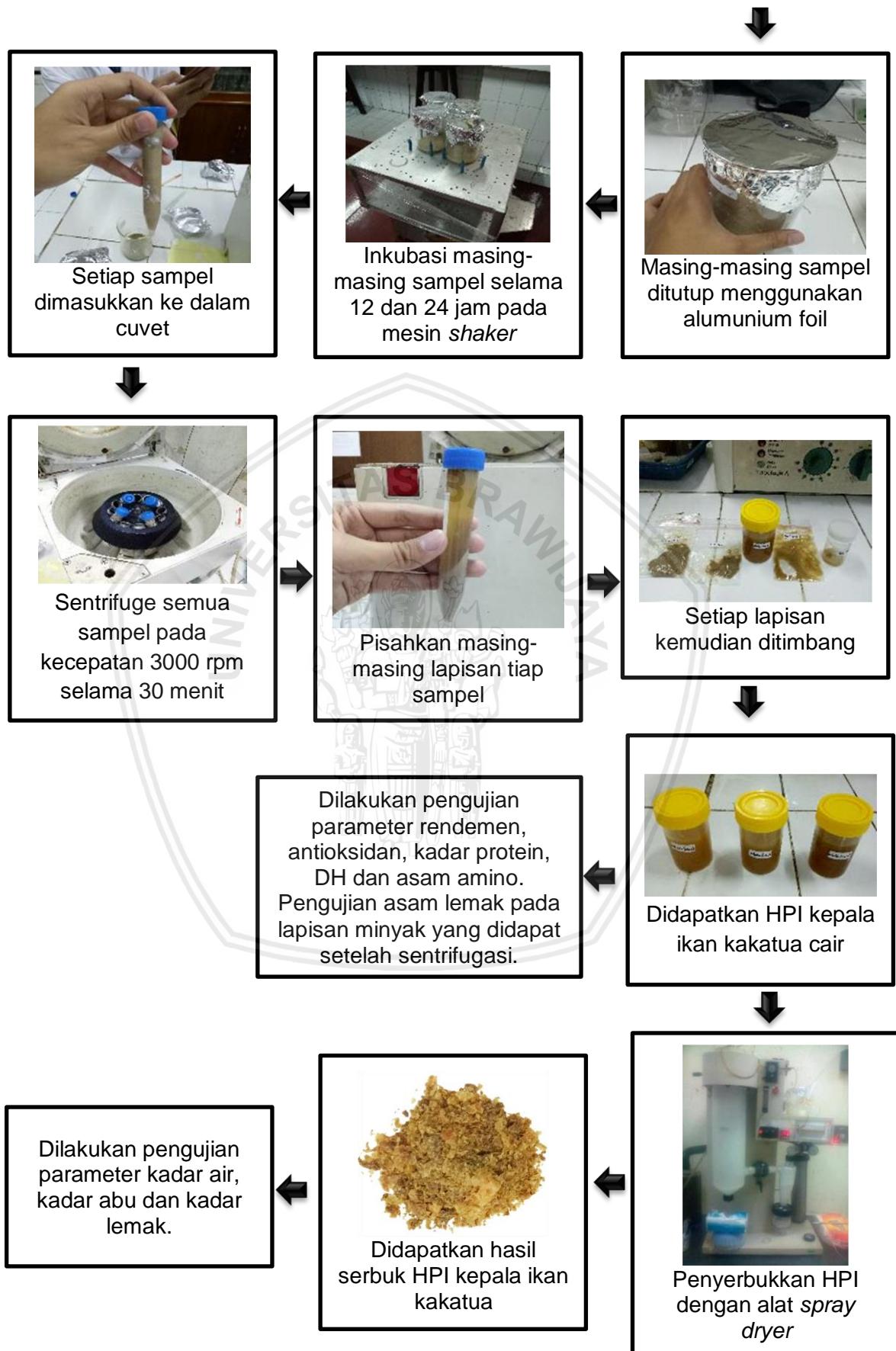
- hydrolysis from tilapia fish waste mince. International Journal Microbial. **6** (12): 3220-3229.
- Sudrajat, A. B. Nur., N. Diniyah dan R. R. Fauziah. 2016. Karakterisasi sifat fisik dan fungsional isolat protein koro benguk (*Mucuna pruriens*). *Prosiding Seminar Nasional*
- Suprapto. 2008. Keragaan penangkapan ikan demersal di kawasan timur Indonesia yang berbasis di Probolinggo. *BAWAL*. **2** (3): 123- 131.
- Surakhmad. 1994. *Pengantar Penelitian Ilmiah Dasar Metode Teknik*. Bandung: Tarsito.
- Sylla, K., Musabyemariya, B., Berge, J.-P. & Seydi, M. 2008. Water ratio effect on the proteins hydrolysis tongue sole by-products (*Cynoglossus senegalensis*). *Revue Africaine de Sante et de Productions Animales (RASPA)*. **6**: 189–194.
- Tejpal,C. S., R. G. K. Lekshmi., K. K. Asha., R. Anandan dan N. S. Chatterjee. 2017. Antioxidant, functional properties and amino acid composition of pepsin-derived protein hydrolysates from whole tilapia waste as influenced by pre-processing ice storage. *J Food Sci Technol*. **1** (1): 11-29.
- Thaddee dan Lyraz I. 1990. Seafood flavorants produced by enzymatic hydrolysis. Alaska: Proceedings of International By-Product Conference. HI,197-201.
- Torino M. I., Limon R. I., M. Villaluenga C., Makinen S., Pihlanto A., V. Valverde C dan Frias J. 2012. Antioxidant and antihypertensive properties of liquid and solid-state fermented lentils. *Journal Food Chemistry*. **136** (2): 1030-1037.
- Triyono, Agus. 2010. Mempelajari pengaruh penambahan beberapa asam pada proses isolasi protein terhadap tepung protein isolat kacang hijau (*Phaseolus radiatus* l.). Seminar Rekayasa Kimia Dan Proses. Universitas Diponegoro Semarang. ISSN : 1411-4216.
- Umayaparvathi, S., Meenakshi S., Vimalraj V., Arumugam M., Sivagami G dan Balasubramanian T. 2014. Antioxidant activity and anticancer effect of bioactive peptide from enzymatic hydrolysate of oyster (*Saccostrea cucullata*). *Biomedicine and Preventive Nutrition*. **4** (3): 1-11.
- 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.
- Widiyanto, R. Rahma., R. Karnila dan M. Ilza. 2018. Analisis komposisi kimia tepung kepala ikan lele dumbo (*Clarias gariepinus*). Jurnal Fakultas Perikanan Dan Kelautan Universitas Riau. Pekanbaru.
- Wijayanti, A.T. 2009. Kajian Penyaringan dan Lama Penyimpanan dalam Pembuatan Fish Pepton dari Ikan Selar Kuning (*Caranx leptolepis*). [Skripsi]. Institut Pertanian Bogor. Bogor.

- Wijayanti, Ima, Romadhon dan L. Rianingsih. 2016. Karakteristik hidrolisat protein ikan bandeng (*Chanos chanos*) dengan konsentrasi enzim bromelin yang berbeda. *Jurnal Saintek Perikanan*. **11** (2): 129-133.
- Winarno, F.G. 1983. *Enzim Pangan*. Cetakan kedua. Jakarta: P.T Gramedia.
- World Wide Fund [WWF] Indonesia. 2015. *Panduan Penanganan dan Penangkapan Ikan Kakatua dan Baronang*. Jakarta: WWF-Indonesia.
- Wu, H.C., Hua M.C dan Chyuan Y. S. 2003. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysate of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Research International*. **36** (7): 949-957.
- Wu, Ted H., J. D. Nigg., J. J. Stine dan P. J. Bechtel. 2011. Nutritional and chemical composition of by-product fractions produced from wet reduction of individual red salmon (*Oncorhynchus nerka*) heads and viscera. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. **20**: 183–195.
- Yu, Yue., F. Fan., DiWu., C. Yu., Z. Wang dan M. Du. 2018. Antioxidant and ACE inhibitory activity of enzymatic hydrolysates from *Ruditapes philippinarum*. *Journal Molecules*. **23**: 1-15.
- Zainol, M.K., bdhamid, A., Yusof, S. dan Muse, R. 2003. Antioxidative activity and total phenolic compounds of leaf, root and petiole of four accessions of *Centella asiatica* (L.) Urban. *Food Chem*. **81**: 575–581.
- 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.

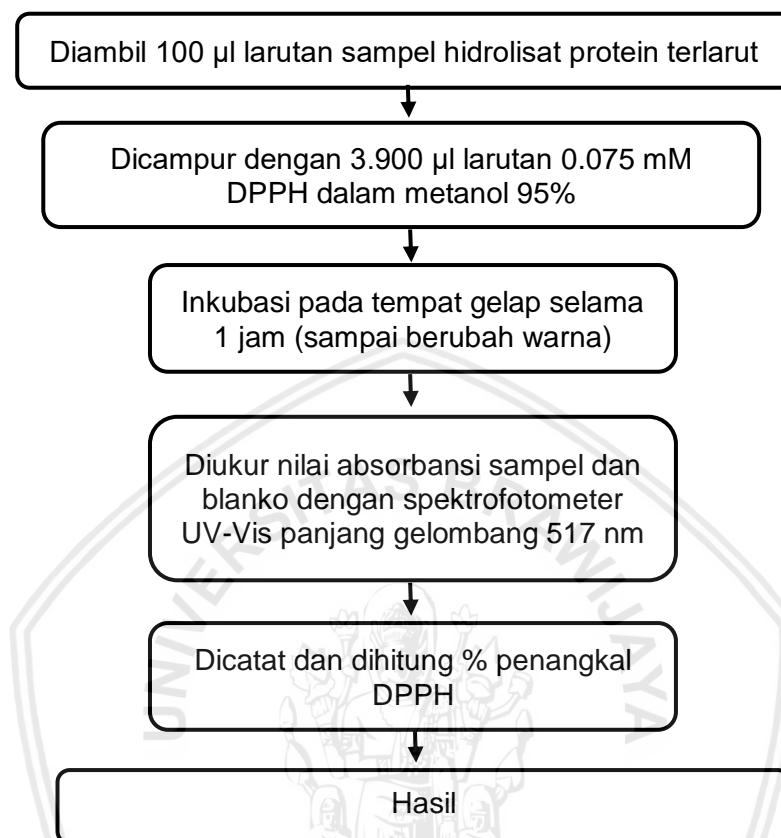
LAMPIRAN

Lampiran 1. Proses Pembuatan Hidrolisat Protein Kepala Ikan Kakatua (*Chlorurus sordidus*)

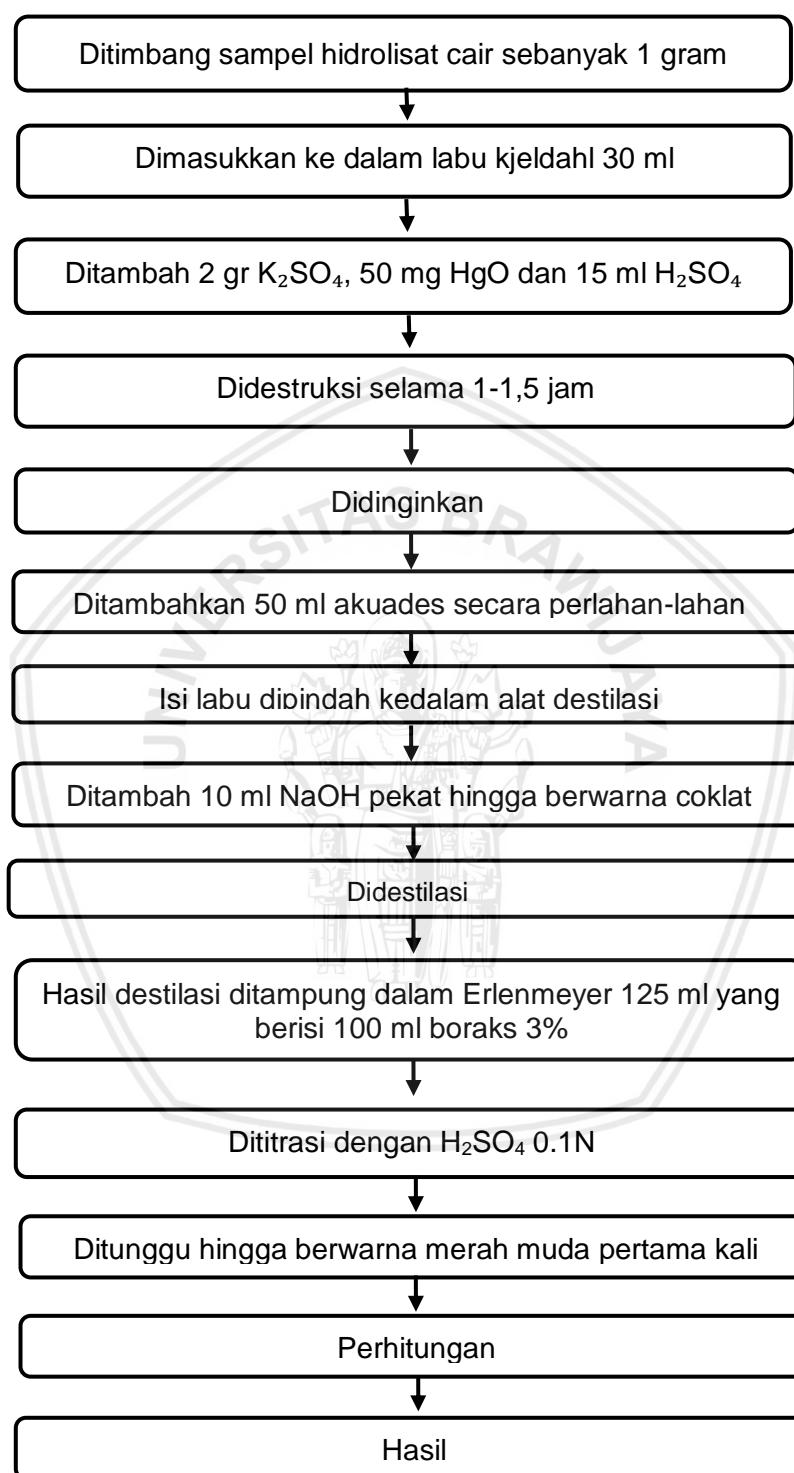




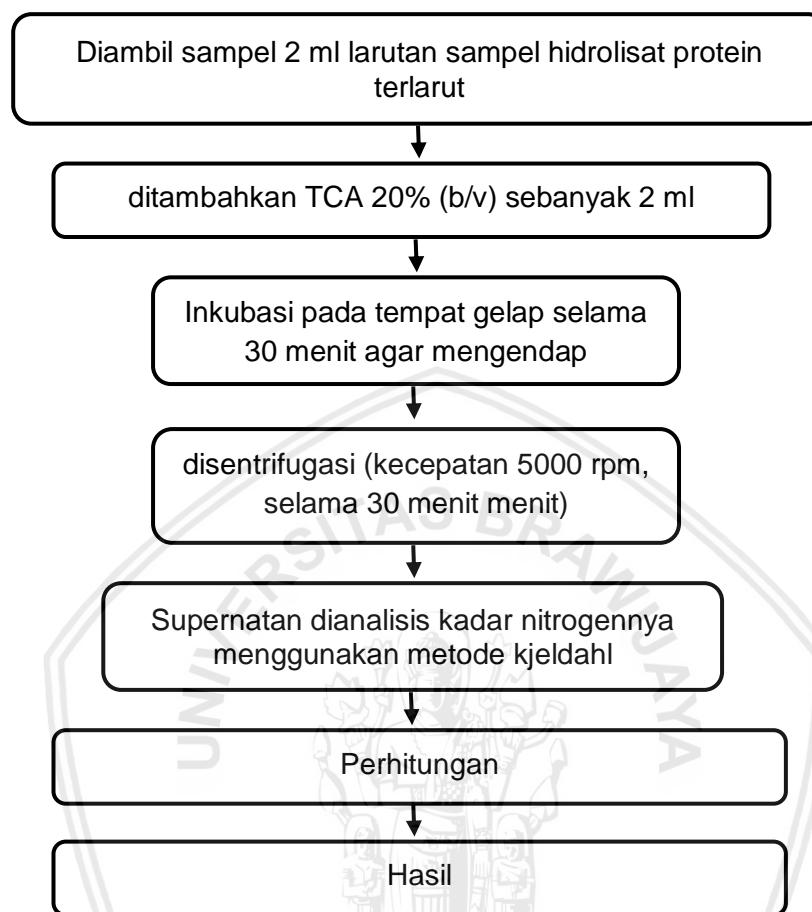
Lampiran 2. Diagram Alir Pengujian Aktivitas Antioksidan (Donkor *et al.*, 2012 dengan modifikasi)



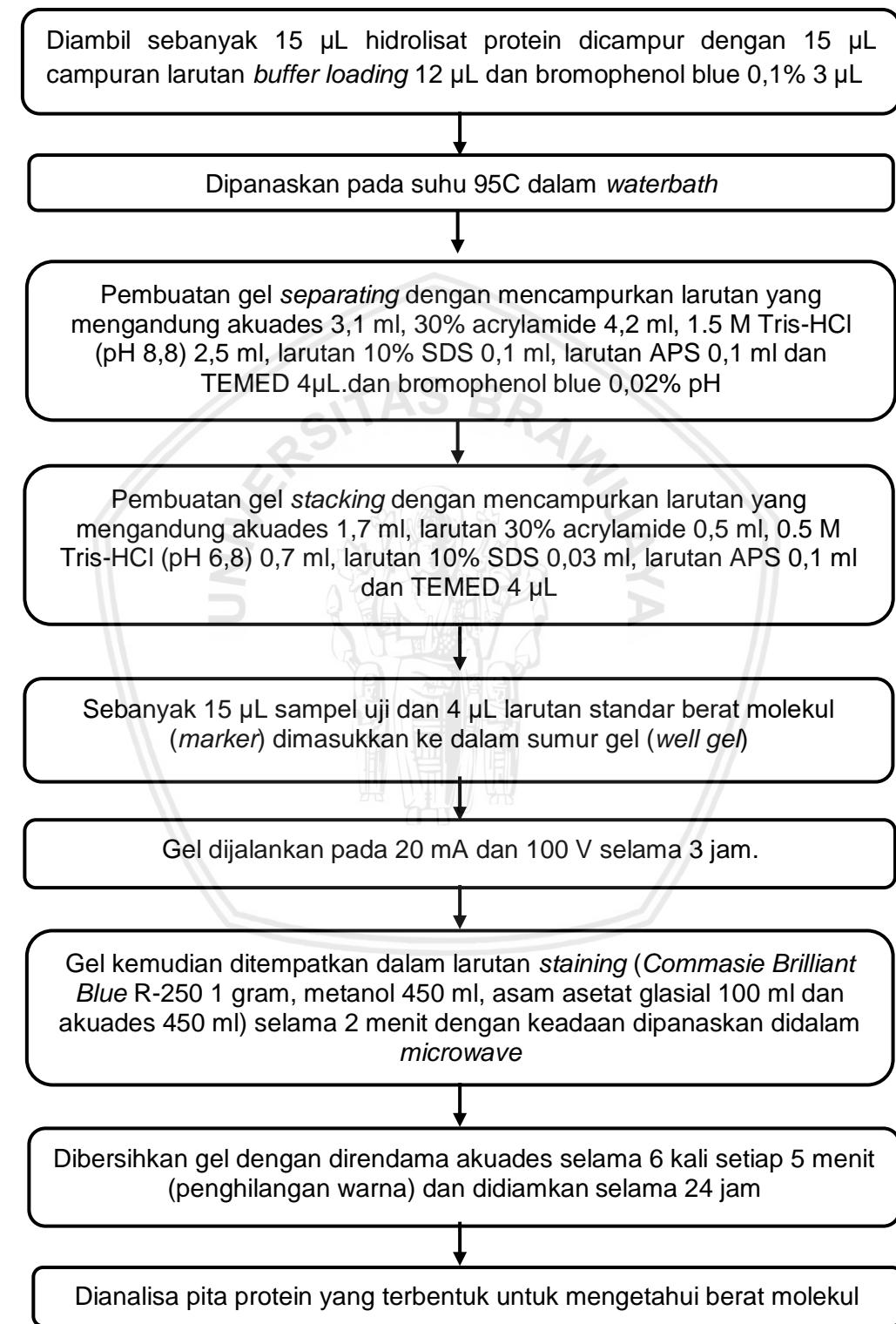
Lampiran 3. Diagram Alir Pengujian Protein (AOAC, 2005)



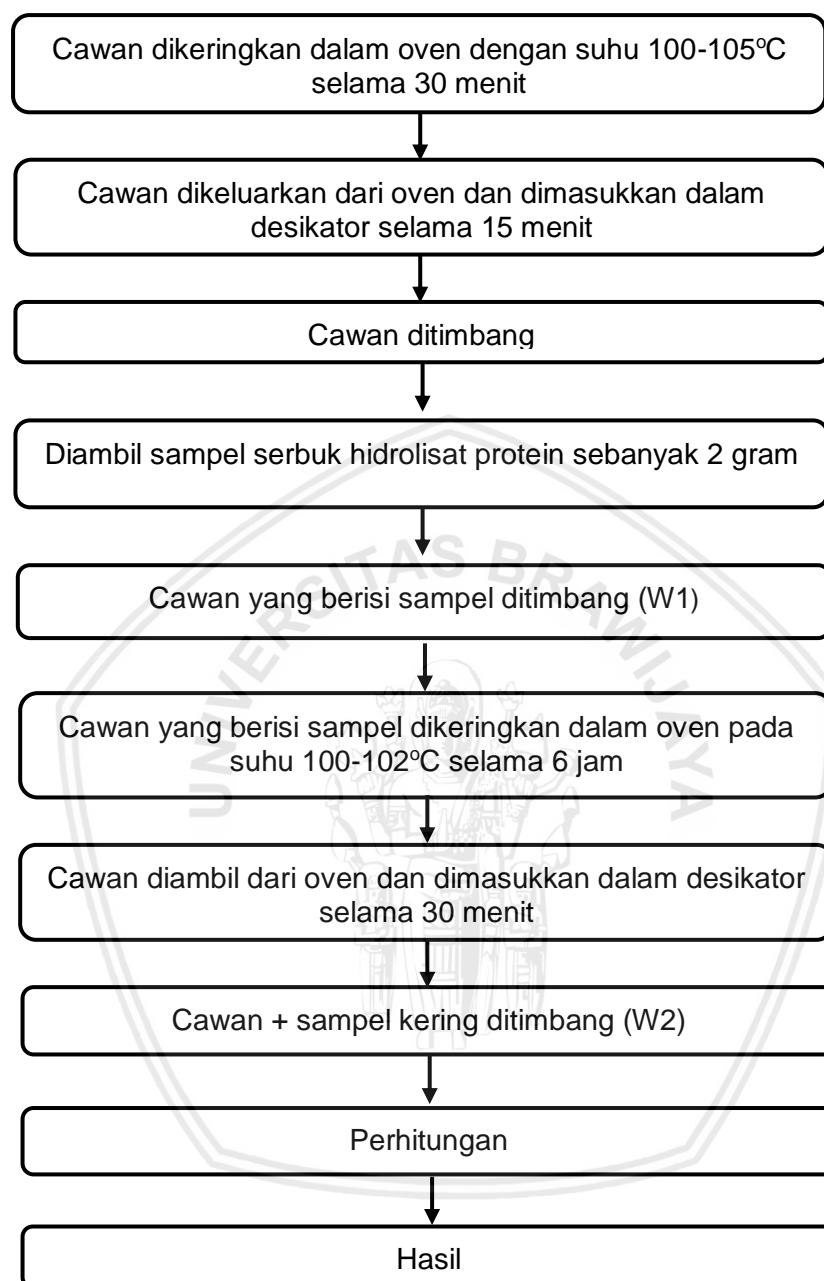
Lampiran 4. Diagram Alir Pengujian Derajat Hidrolisis (DH) (Hoyle dan Merritt, 1994)



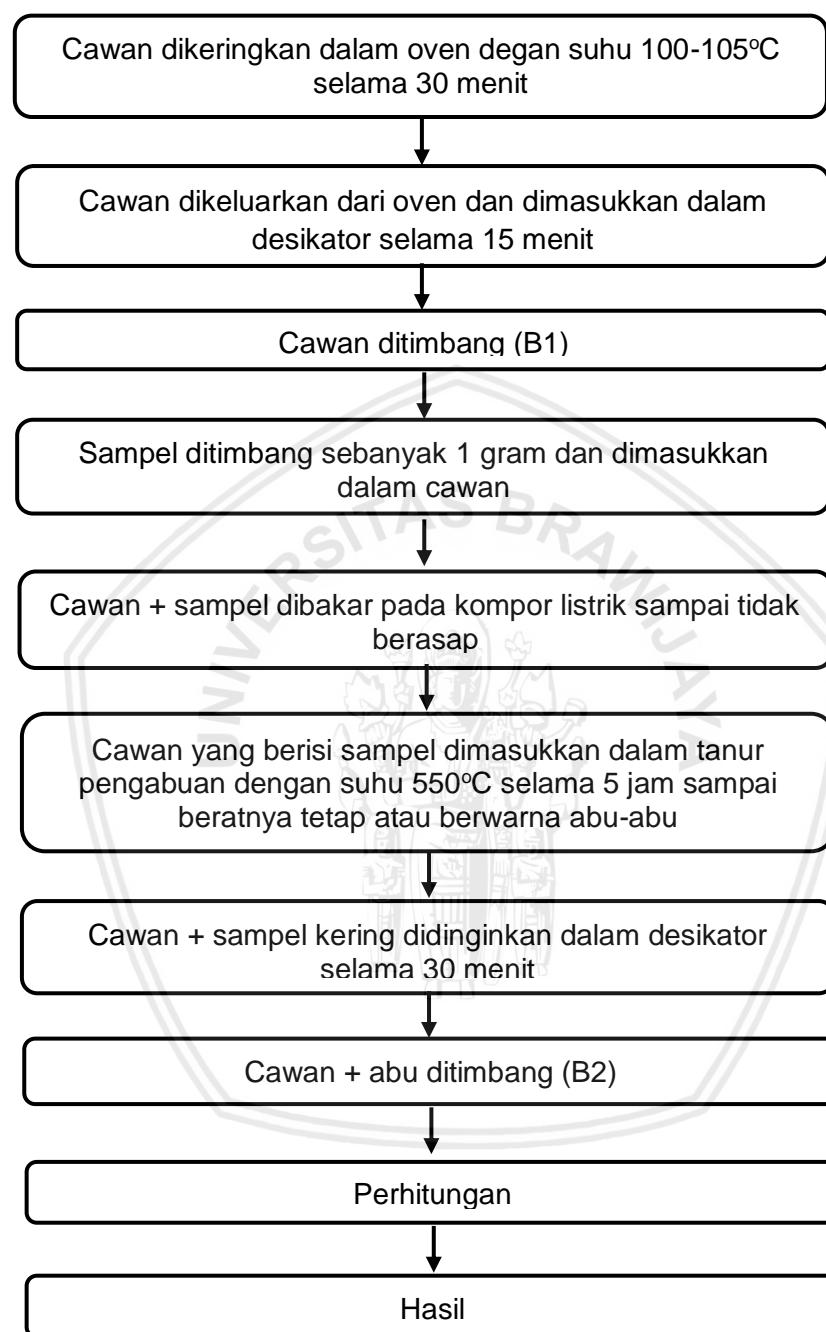
Lampiran 5. Diagram Alir Pengujian Berat Molekul (SDS PAGE) (Dissanayake dan Vasiljevic, 2009 dengan modifikasi)



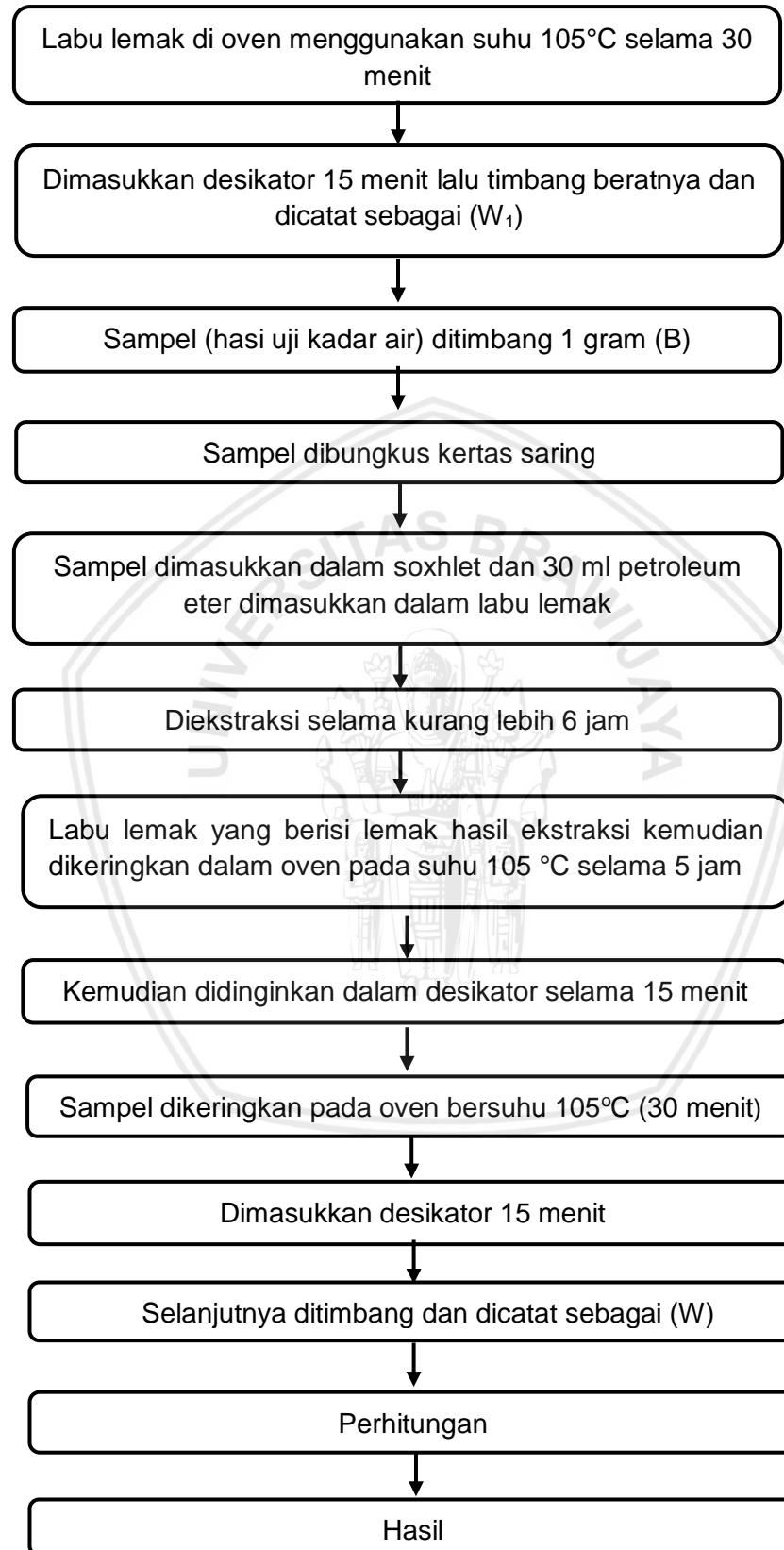
Lampiran 6. Diagram Alir Pengujian Kadar Air (AOAC, 2005)



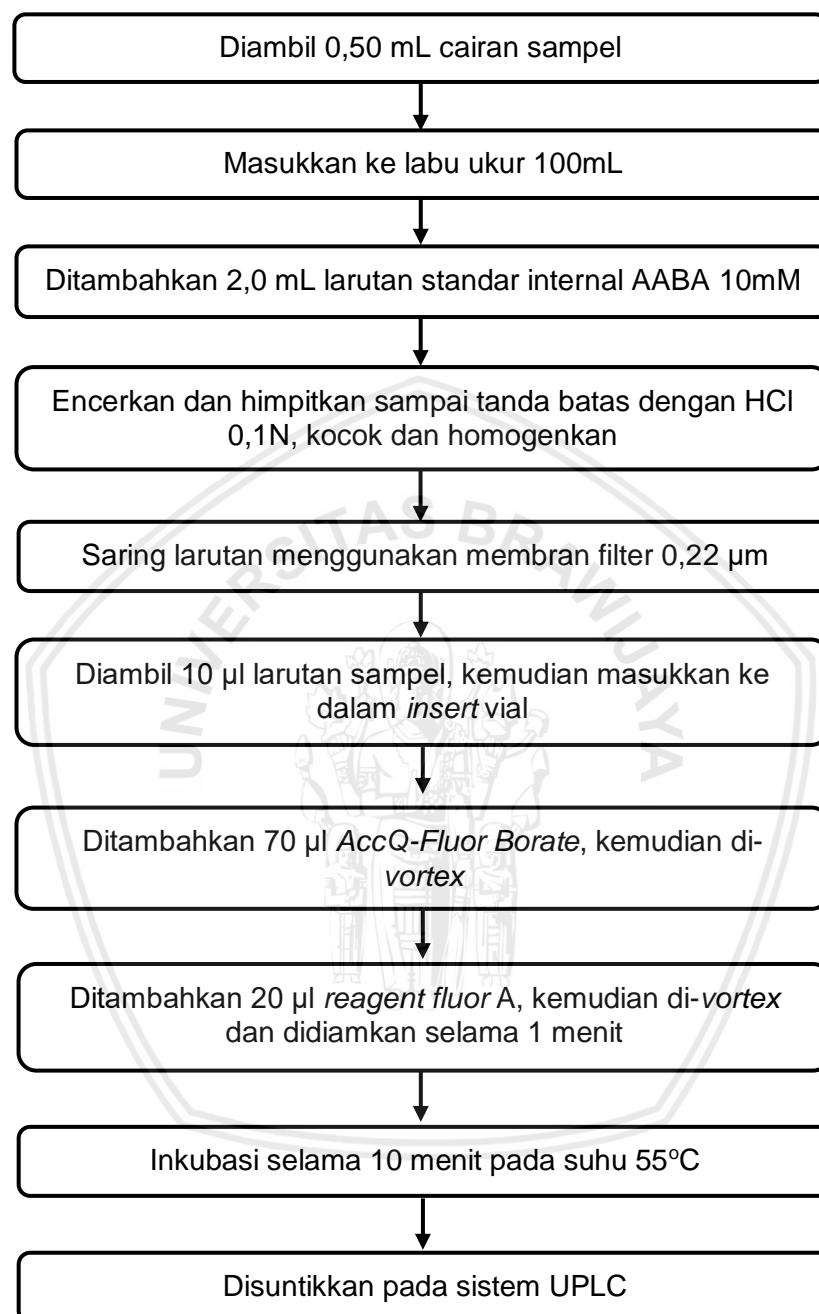
Lampiran 7. Diagram Alir Pengujian kadar Abu (AOAC, 2005)



Lampiran 8. Diagram Alir Pengujian Kadar Lemak (AOAC, 2005)



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



Lampiran 10. Perhitungan Pembuatan Larutan HCl 6N dan NaOH 6N

1. Membuat larutan NaOH 6N dalam 100 ml akuades

$$N = \frac{\text{gram}}{\text{BE}} \times \frac{1000}{100}$$

$$6 = \frac{\text{gram}}{40} \times \frac{1000}{100}$$

$$\text{Gram} = 24$$

Jadi, 24 gram serbuk NaOH diencerkan dalam 100 ml akuades untuk membuat larutan NaOH 6N dalam 100 ml.

2. Membuat larutan HCl 6N pada pengenceran 100 ml akuades (HCl pekat = 32%)

$$N = \frac{\{(10.\%.\text{BJ}) \times \text{Valensi}\}}{\text{BM}}$$

$$N = \frac{\{(10.32.1,19) \times 1\}}{36,5}$$

$$= 10,43N$$

- Volume HCl pekat yang diambil

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

$$10,43 \cdot V_1 = 6 \cdot 100$$

$$V_1 = 57,53 \text{ ml}$$

Jadi, 57,53 ml HCl pekat diambil dan ditambahkan dengan akuades sampai volume menjadi 100 ml H₂SO₄ untuk membuat HCl 6N.

Lampiran 11. Perhitungan Pembuatan Larutan DPPH 0.075 mM dalam Metanol 95% Sebanyak 100 ml

- Mol DPPH

$$M = \frac{\text{mol}}{\text{Vol (l)}}$$
$$0,075 \cdot 10^{-3} = \frac{\text{mol}}{0,1}$$

$$\text{mol} = 7,5 \cdot 10^{-3}$$

- Berat DPPH yang harus diambil untuk diencerkan dalam 100 ml metanol

$$\text{mol} = \frac{\text{gram}}{\text{Mr}}$$
$$7,5 \cdot 10^{-3} = \frac{\text{gram}}{394,3}$$
$$\text{gram} = 0,003 \text{ gr (0,00296 gr)}$$

Jadi, diambil 0,00296 gram DPPH kemudian diencerkan dengan metanol sampai 100 ml (menggunakan labu ukur) untuk menghasilkan larutan DPPH 0.075mM dalam metanol 95% sebanyak 100 ml.

Lampiran 12. Perhitungan Pembuatan Larutan H₂SO₄ 0.1N

- Membuat larutan H₂SO₄ 0.1 N pada pengenceran 100 ml akuades (H₂SO₄ pekat = 96%)

$$N = \frac{\{(10\% \cdot BJ) \times \text{Valensi}\}}{BM}$$

$$N = \frac{\{(10.96 \cdot 1,84) \times 2\}}{98,08}$$

$$= 36 \text{ N}$$

- Volume H₂SO₄ pekat yang diambil

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

$$36 \cdot V_1 = 0,1 \cdot 100$$

$$V_1 = 0,28 \text{ ml}$$

Jadi, 0,28 ml H₂SO₄ pekat diambil dan ditambahkan dengan akuades sampai volume menjadi 100 ml pada labu ukur untuk membuat H₂SO₄ 0.1N.

Lampiran 13. Perhitungan Pembuatan Larutan 0.5 M Tris-HCl (pH 6,8) dan 1.5 M Tris-HCl (pH 8,8)

1. Membuat Larutan 0.5 M Tris-HCl (pH 6,8) sebanyak 100 ml

- mol 0.5 M Tris-HCl
- Berat Trisbase yang diencerkan

$$M = \frac{\text{mol}}{\text{Vol (l)}}$$

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

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

$$\text{mol} = \frac{\text{gram}}{\text{Mr}}$$

$$0,05 = \frac{\text{gram}}{121,14}$$

$$\text{gram} = 6,057$$

Jadi, diambil sebanyak 6,057 gram Trisbase kemudian ditambahkan akuades sampai 60 ml dan disesuaikan pH 6,8 dengan HCl 6N. Setelah pH sesuai ditambahkan akuades sampai volumenya 100 ml.

2. Membuat Larutan 1.5 M Tris-HCl (pH 8,8) sebanyak 150 ml

- mol 1.5 M Tris-HCl
- Berat Trisbase yang diencerkan

$$M = \frac{\text{mol}}{\text{Vol (l)}}$$

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

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

$$\text{mol} = \frac{\text{gram}}{\text{Mr}}$$

$$0,225 = \frac{\text{gram}}{121,14}$$

$$\text{gram} = 27,26$$

Jadi, diambil sebanyak 27,26 gram Trisbase kemudian ditambahkan akuades sampai 100 ml dan disesuaikan pH 8,8 dengan HCl 6N. Setelah pH sesuai ditambahkan akuades sampai volumenya 150 ml.

Lampiran 14. Analisis keragaman pengaruh pH dan lama hidrolisis terhadap nilai Rendemen

Factor Information

Factor	Type	Levels	Values
pH	Fixed	4	5,0; 6,4; 7,0; 9,0
Lama Hidrolisis	Fixed	2	12; 24

Anova

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
pH	3	31,78	10,592	11,61	0,000
Lama Hidrolisis	1	506,95	506,949	555,51	0,000
pH*Lama Hidrolisis	3	16,75	5,584	6,12	0,006
Error	16	14,60	0,913		
Total	23	570,08			

Tukey Pairwise Comparisons: pH*Lama Hidrolisis

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

pH*Lama Hidrolisis	N	Mean	Grouping
9,0 24	3	49,0388	A
7,0 24	3	48,3699	A
6,4 24	3	47,4793	A B
5,0 24	3	45,4005	B
9,0 12	3	40,2764	C
6,4 12	3	39,1458	C
5,0 12	3	37,7344	C D
7,0 12	3	36,3642	D

Means that do not share a letter are significantly different.

Lampiran 15. Analisis keragaman pengaruh pH dan lama hidrolisis terhadap nilai Aktivitas Antioksidan

Factor Information				
Factor	Type	Levels	Values	
pH	Fixed	4	5,0; 6,4; 7,0; 9,0	
Lama Hidrolisis	Fixed	2	12; 24	

Anova

Analysis of Variance					
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
pH	3	136,99	45,662	33,86	0,000
Lama Hidrolisis	1	537,04	537,039	398,26	0,000
pH*Lama Hidrolisis	3	54,58	18,193	13,49	0,000
Error	16	21,58	1,348		
Total	23	750,18			

Tukey Pairwise Comparisons: pH*Lama Hidrolisis			
Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence			
pH*Lama Hidrolisis	N	Mean	Grouping
9,0 24	3	58,2028	A
7,0 24	3	56,3091	A B
6,4 24	3	54,5760	B
5,0 24	3	49,2424	C
9,0 12	3	48,8526	C
5,0 12	3	44,5042	D
6,4 12	3	43,7919	D
7,0 12	3	43,3384	D

Means that do not share a letter are significantly different.

Lampiran 16. Analisis keragaman pengaruh pH dan lama hidrolisis terhadap nilai Kadar Protein

Factor Information				
Factor	Type	Levels	Values	
pH	Fixed	4	5,0; 6,4; 7,0; 9,0	
Lama Hidrolisis	Fixed	2	12; 24	

Anova

Analysis of Variance					
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
pH	3	78,258	26,086	24,89	0,000
Lama Hidrolisis	1	366,196	366,196	349,40	0,000
pH*Lama Hidrolisis	3	17,929	5,976	5,70	0,022
Error	8	8,385	1,048		
Total	15	470,767			

Tukey Pairwise Comparisons: pH*Lama Hidrolisis

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

pH*Lama Hidrolisis	N	Mean	Grouping
9,0 24	2	38,5875	A
7,0 24	2	33,5475	B
6,4 24	2	33,3900	B
5,0 24	2	33,0750	B
9,0 12	2	28,1925	C
5,0 12	2	26,6175	C
6,4 12	2	24,2550	C D
7,0 12	2	21,2625	D

Means that do not share a letter are significantly different.

Lampiran 17. Analisis keragaman pengaruh pH dan lama hidrolisis terhadap nilai Derajat Hidrolisis

Factor Information

Factor	Type	Levels	Values
pH	Fixed	4	5,0; 6,4; 7,0; 9,0
Lama Hidrolisis	Fixed	2	12; 24

Anova

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
pH	3	30,00	10,001	4,51	0,039
Lama Hidrolisis	1	161,16	161,161	72,63	0,000
pH*Lama Hidrolisis	3	28,75	9,582	4,32	0,044
Error	8	17,75	2,219		
Total	15	237,66			

Tukey Pairwise Comparisons: pH*Lama Hidrolisis

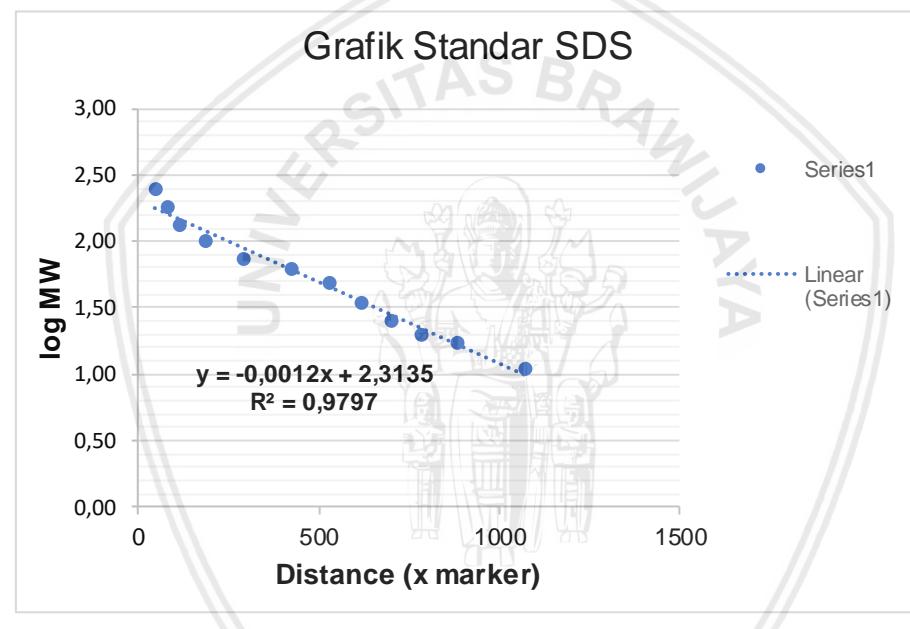
Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

pH*Lama Hidrolisis	N	Mean	Grouping
9,0 24	2	30,6489	A
7,0 24	2	29,6048	A B
6,4 24	2	28,0894	A B C
5,0 24	2	24,7732	A B C D
9,0 12	2	24,0385	B C D
5,0 12	2	22,4699	C D
6,4 12	2	21,4599	D
7,0 12	2	19,7582	D

Means that do not share a letter are significantly different.

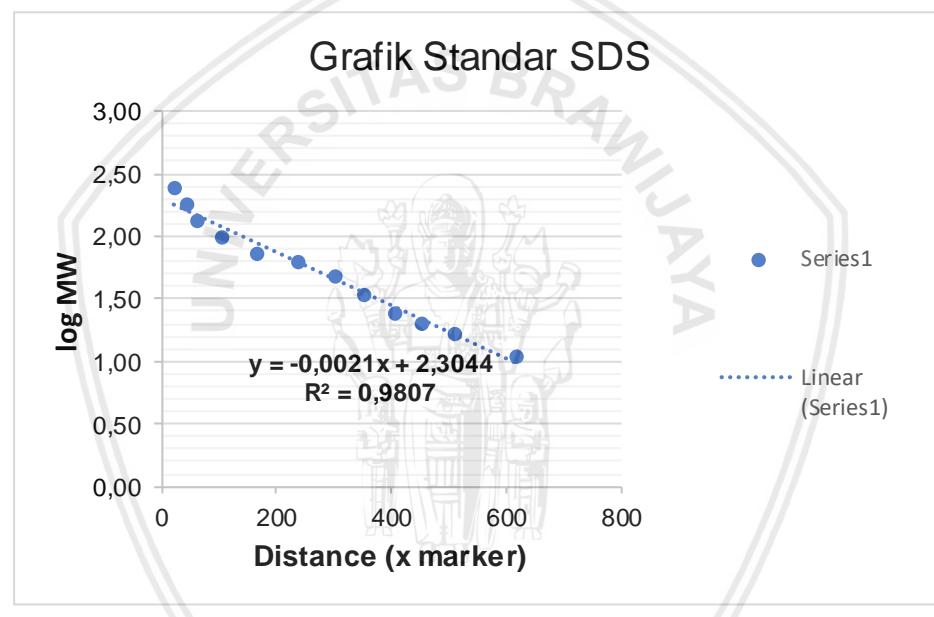
Lampiran 18. Data jarak band SDS dan kurva standar

Marker					
No	MW	Distance (x) marker	Log MW	a (grafik)	b
1	245	45	2,39	-0,0012	2,3135
2	180	81	2,26	-0,0012	2,3135
3	135	115	2,13	-0,0012	2,3135
4	100	187	2,00	-0,0012	2,3135
5	75	291	1,88	-0,0012	2,3135
6	63	423	1,80	-0,0012	2,3135
7	48	527	1,68	-0,0012	2,3135
8	35	617	1,54	-0,0012	2,3135
9	25	703	1,40	-0,0012	2,3135
10	20	785	1,30	-0,0012	2,3135
11	17	885	1,23	-0,0012	2,3135
12	11	1073	1,04	-0,0012	2,3135



Kontrol 0 jam			pH 9, 24 jam			pH 7, 24 jam			pH 5, 24 jam		
Distance	RF	kDa	Distance	RF	kDa	Distance	RF	kDa	Distance	RF	kDa
59	2,24	174,86	317	1,93	85,72	311	1,94	87,16	313	1,94	86,68
165	2,12	130,47	375	1,86	73,03	379	1,86	72,23	373	1,87	73,43
			400	1,83	68,16	403	1,83	67,59	391	1,84	69,87
			537	1,67	46,68	835	1,31	20,49			
			891	1,24	17,55						
pH 9, 12 jam			pH 7, 12 jam			pH 5, 12 jam					
Distance	RF	kDa	Distance	RF	kDa	Distance	RF	kDa	Distance	RF	kDa
185	2,09	123,45	311	1,94	87,16	305	1,95	88,61			
323	1,93	84,31	366	1,87	74,87	375	1,86	73,03			
370	1,87	74,05				849	1,29	19,71			
791	1,36	23,14									

Marker					
No	MW	Distance (x) marker	Log MW	a (grafik)	b
1	245	21	2,39	-0,0021	2,3044
2	180	43	2,26	-0,0021	2,3044
3	135	63	2,13	-0,0021	2,3044
4	100	105	2,00	-0,0021	2,3044
5	75	166	1,88	-0,0021	2,3044
6	63	239	1,80	-0,0021	2,3044
7	48	302	1,68	-0,0021	2,3044
8	35	352	1,54	-0,0021	2,3044
9	25	406	1,40	-0,0021	2,3044
10	20	454	1,30	-0,0021	2,3044
11	17	512	1,23	-0,0021	2,3044
12	11	618	1,04	-0,0021	2,3044



Kontrol, 12 jam			Kontrol, 24 jam		
Distance	RF	kDa	Distance	RF	kDa
153	1,98	96,18	202	1,88	75,89
200	1,88	76,63	232	1,82	65,64
236	1,81	64,39	240	1,80	63,15
			326	1,62	41,67
			499	1,26	18,05

Lampiran 19. Analisis keragaman pengaruh pH dan lama hidrolisis terhadap nilai Kadar Air

Factor Information				
Factor	Type	Levels	Values	
pH	Fixed	4	5,0; 6,4; 7,0; 9,0	
Lama Hidrolisis	Fixed	2	12; 24	

Anova

Analysis of Variance					
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
pH	3	1,0208	0,3403	0,42	0,744
Lama waktu	1	2,6732	2,6732	3,30	0,107
pH*Lama waktu	3	0,4778	0,1593	0,20	0,896
Error	8	6,4817	0,8102		
Total	15	10,6536			

Lampiran 20. Analisis keragaman pengaruh pH dan lama hidrolisis terhadap nilai Kadar Abu

Factor Information				
Factor	Type	Levels	Values	
pH	Fixed	4	5,0; 6,4; 7,0; 9,0	
Lama Hidrolisis	Fixed	2	12; 24	

Anova

Analysis of Variance					
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
pH	3	31,6214	10,5405	24,76	0,000
Lama Hidrolisis	1	0,0473	0,0473	0,11	0,747
pH*Lama Hidrolisis	3	0,6108	0,2036	0,48	0,706
Error	8	3,4051	0,4256		
Total	15	35,6845			

Tukey Pairwise Comparisons: pH

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

pH	N	Mean	Grouping
9,0	4	8,2775	A
5,0	4	6,9200	A
7,0	4	5,2750	B
6,4	4	4,7000	B

Means that do not share a letter are significantly different.

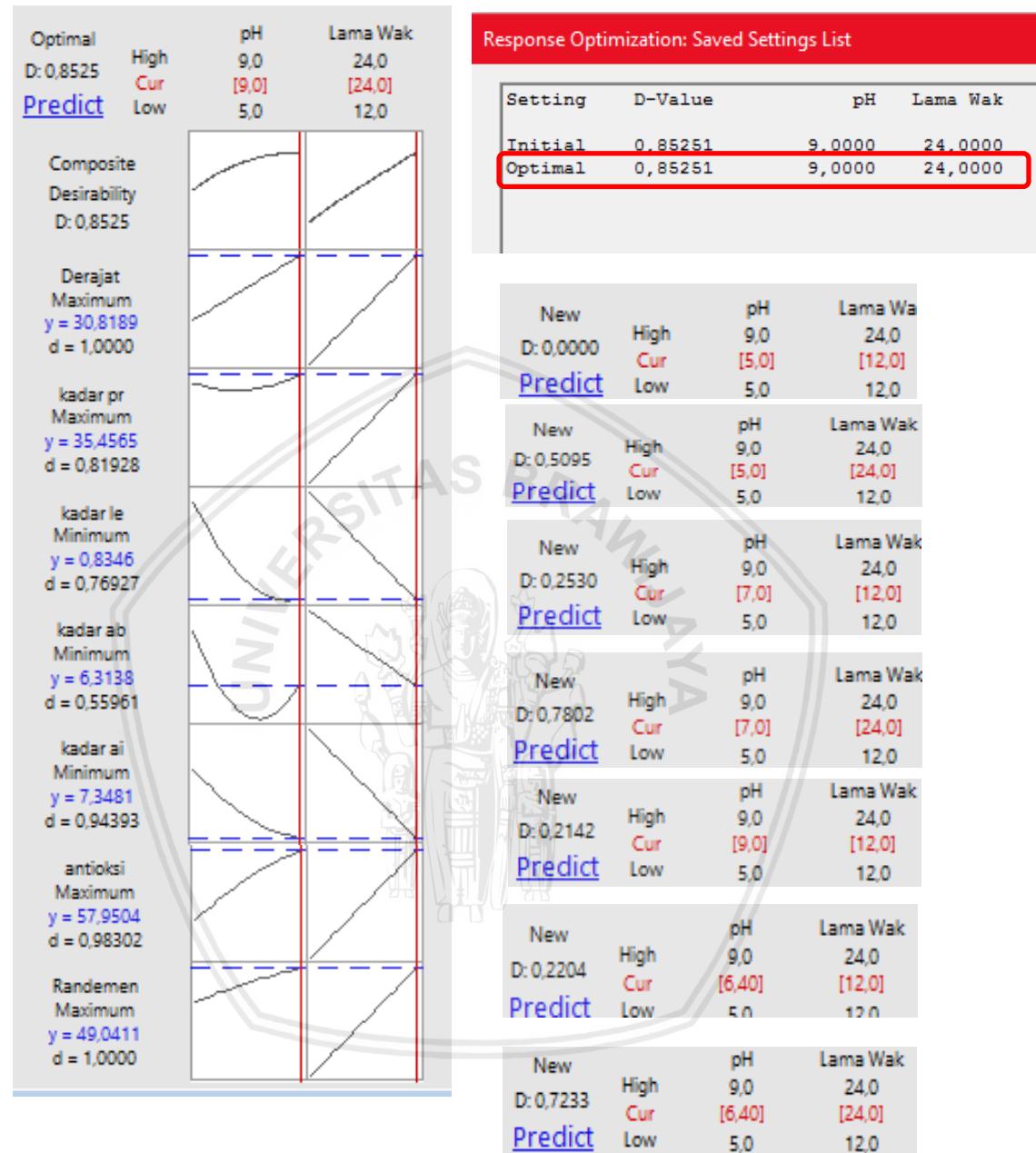
Lampiran 21. Analisis keragaman pengaruh pH dan lama hidrolisis terhadap nilai Kadar Lemak

Factor Information				
Factor	Type	Levels	Values	
pH	Fixed	4	5,0; 6,4; 7,0; 9,0	
Lama Hidrolisis	Fixed	2	12; 24	

Anova

Analysis of Variance					
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
pH	3	0,28942	0,096473	0,94	0,466
Lama Hidrolisis	1	0,34516	0,345156	3,35	0,104
pH*Lama Hidrolisis	3	0,01417	0,004723	0,05	0,986
Error	8	0,82325	0,102906		
Total	15	1,47199			

Lampiran 22. Nilai optimasi HPI kepala ikan kakatua



Lampiran 23. Hasil pengujian karakteristik HPI kepala ikan kakatua dengan perlakuan pH dan lama hidrolisis yang berbeda, serta standar HPI

pH	Lama Hidrolisis	Parameter							
		Rendemen (%)	Aktivitas Antioksidan (%)	Kadar Air (%)	Kadar Abu (%)	Kadar Lemak (%)	Kadar Protein (%)	DH (%)	Berat Molekul
5	12	37,73±0,92	44,5±1,5	8,63±0,99	6,8±0,69	1,35±0,35	26,61±1,11	22,47±0,73	19,71 kDa; 73,03 kDa dan 88,61 kDa
	24	45,4±1,17	49,24±1,35	8,24±1,06	7,04±1,06	1,02±0,23	33,07±0,44	24,77±1,69	69,87 kDa; 73,43 kDa dan 86,68 kDa
7	12	36,36±1,03	43,34±0,62	8,41±0,67	5,05±0,64	1,25±0,5	21,26±1,11	19,76±0,75	74,87 kDa dan 87,16 kDa
	24	48,37±0,63	56,31±0,78	7,25±1,06	5,5±0,7	0,89±0,25	33,55±1,11	29,60±1,65	20,49 kDa; 67,59 kDa; 72,23 dan 87,16 kDa
9	12	40,28±0,63	48,85±1,57	9±0,71	8,56±0,78	0,97±0,47	28,19±0,67	24,04±1,36	23,14 kDa; 74,05 kDa; 84,31 kDa dan 123,45 kDa
	24	49,04±0,9	58,2±0,55	7,85±1,2	8±0,17	0,68±0,13	38,59±1,56	30,65±1,82	17,55 kDa; 46,68 kDa; 68,16 kDa; 73,03 kDa dan 85,72 kDa
Kontrol (pH 6,4)	12	39,15±0,87	43,79±1,13	8,39±0,74	4,55±0,35	1,2±0,14	22,26±0,89	21,46±1,71	64,39kDa; 76,63 kDa dan 96,18 kDa
	24	47,48±1,29	54,58±1,31	7,82±0,55	4,85±0,35	1±0,28	33,39±0,89	28,09±1,75	18,05 kDa; 41,67 kDa; 63,15 kDa; 65,64 kDa dan 75,89 kDa
Standar HPI Komersil (IQI, 2005)		-	-	3-5	4-7	19-22	73-75	-	-
HPI untuk Flavour Enhancer (Thaddee dan Lyraz, 1990)		-	-	5	2-8	2	45	-	-

