

## HIDROLISIS PROTEIN IKAN PATIN MENGGUNAKAN ENZIM PAPAIN DAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN HIDROLISATNYA

### *Protein Hydrolysis from Catfish Prepared by Papain Enzyme and Antioxidant Activity of Hydrolyzate*

**Ace Baehaki\*, Shanti Dwita Lestari, Achmad Rizky Romadhoni**

Program Studi Teknologi Hasil Perikanan

Fakultas Pertanian Universitas Sriwijaya Indralaya, Jalan Palembang-Prabumulh Km 32, Indaralaya Ogan Ilir Sumatera Selatan. Telepon: (0711) 580934.

\*Korespondensi: [ace76\\_none@yahoo.com](mailto:ace76_none@yahoo.com)

Diterima: 2 Oktober 2015 / Disetujui: 17 Desember 2015

#### **Abstrak**

Penelitian ini tujuan membuat hidrolisat protein dari ikan patin (*Pangasius pangasius*) secara enzimatis menggunakan enzim papain dan menganalisis aktivitas antioksidan dari hidrolisat protein yang dihasilkan. Penelitian ini menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap dengan satu faktor perlakuan dua ulangan, dengan perlakuan perbedaan konsentrasi enzim papain (0%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, dan 6%). Parameter yang diamati adalah antioksidan menggunakan metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), kandungan protein, dan berat molekul protein yang ditentukan dengan metode SDS-PAGE (*Sodium Dodecil Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*). Hasil menunjukkan nilai persentase derajat hidrolisis yang didapat tertinggi pada perlakuan dengan konsentrasi enzim papain 6% yaitu sebesar 71,98%. Persen penghambatan antioksidan hidrolisat protein yang dihasilkan berkisar antara 37,85%-67,62%. Nilai protein berkisar antara 20,86-54,47 mg/ml. Hidrolisat yang dihasilkan memiliki berat molekul antara 11,90- 65,20 kDa.

Kata kunci: Antioksidan, enzim papain, ikan patin, protein hidrolisat

#### **Abstract**

The objective of this research was to make a protein hydrolysates from catfish (*Pangasius pangasius*) enzymatically using papain enzyme and analyzed the antioxidant activity of protein hydrolysates produced. The research used the method completely randomized design with two replications the treatment were the difference concentration of the papain enzyme (0%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, and 6%). The parameters of research were antioxidative activity using DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), protein content, and molecular weight using SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*). The results showed that catfish protein hydrolysates prepared by papain enzyme has antioxidative activity. The highest degree of hydrolysis was 71.98% at enzyme concentration of 6%. Based on the DPPH scavenging method catfish protein hydrolysates has the antioxidative activity with the value 37.85-67.62%. The protein content of catfish protein hydrolysates were 20.86-54.47 mg/ml. The molecular weight of catfish protein hydrolyzates were 11.90-65.20 kDa.

Keywords: Antioxidant, catfish, papain enzyme, protein hydrolyzate

#### **PENDAHULUAN**

Antioksidan didefinisikan sebagai substansi yang secara signifikan menghambat proses oksidasi pada

konsentrasi rendah. Antioksidan dapat bekerja pada level yang berbeda dalam urutan oksidasi (Jun *et al.* 2004). Berdasarkan sumbernya antioksidan

ada dua yaitu antioksidan alami dan antioksidan sintetik. Antioksidan sintetik seperti *butylated hydroxyanisole* (BHA), *butylated hydroxytoluene* (BHT), *tertiary butylhydroquinone* (TBHQ) dan *propyl gallate* ditambahkan pada produk pangan untuk memperlambat oksidasi lemak (Wanita & Lorenz 1996). Akan tetapi, penggunaan antioksidan sintetik pada bahan pangan harus mentaati regulasi yang ketat, karena berpotensi berbahaya terhadap kesehatan (Park *et al.* 2001). BHT dapat menyebabkan perubahan tiroid tikus, stimulasi sintesis DNA dan induksi enzim (Faraget *et al.* 1989).

Antioksidan terdapat secara alami dalam hampir semua bahan pangan, baik yang berasal dari daratan maupun perairan. Oleh sebab itu pencarian antioksidan alami sebagai alternatif antioksidan sintetik mendapat perhatian yang besar dikalangan peneliti. Beberapa penelitian aktivitas antioksidan dari protein sudah dilakukan seperti protein ikan gerring (Gasualdo & Li-Chan 1999), hidrolisat gelatin kulit ikan Allaska Pollack (Kim *et al.* 2001), protein kuning telur (Park *et al.* 2001), protein daging babi (Carsen *et al.* 2003), protein ikan yellowfin (Jun *et al.* 2004) dan protein tulang ikan tuna (Je *et al.* 2007). Hidrolisat protein menunjukkan potensi sebagai antioksidan melalui kemampuannya dalam memerangkap radikal bebas (*free radical scavenging*), donor proton dan pengikat ion logam (Samaranayaka dan Li-Chan 2011).

Hidrolisat protein ikan adalah suatu produk hasil hidrolisis protein secara enzimatis dengan memanfaatkan enzim protease. Dibandingkan dengan hidrolisis secara kimia, hidrolisis enzimatis lebih menguntungkan karena tidak mengakibatkan kerusakan peptida dan asam amino. Papain merupakan enzim protease yaitu enzim yang mengkatalisa reaksi pemecahan rantai polipeptida pada protein dengan cara menghidrolisa ikatan

peptidanya menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana seperti peptida dan asam amino.

Merujuk dari beberapa hal di atas, proses pembuatan hidrolisat protein ikan masih perlu untuk dikaji dan dilakukan. Selain bahan baku berupa ikan yang cukup banyak tersedia dapat dimanfaatkan secara optimal, juga tersedianya bahan penghidrolisa berbentuk enzim papain yang dapat digunakan dengan aman. Tujuan dari penelitian ini adalah memperoleh hidrolisat protein dari ikan patin (*Pangasius pangasius*) menggunakan enzim papain yang memiliki aktivitas antioksidan terbaik.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan dan Alat

Bahan baku yang digunakan dalam penelitian ini untuk membuat hidrolisat protein adalah daging ikan patin (*Pangasius pangasius*) dan enzim papain. Bahan kimia yang dibutuhkan untuk analisis parameter pengamatan yaitu hidrolisat protein ikan, kristal 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (Sigma-aldrich), metanol (Merck), Na-bisulfit (Merck), HCl (Ajax Finechem), NaOH (Merck), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Merck), H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (Merck), asam tricloroasetat (Merck) dan asam asetat glacial (Merck). Peralatan yang digunakan pada penelitian ini adalah waterbath sheaker, oven, sentrifuse, timbangan analitik, dan spektrofotometer (Shimidu).

### Prosedur Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan perbedaan konsentrasi enzim sebagai perlakuan dan setiap perlakuan dilakukan dua kali ulangan. Perlakuan yang digunakan dalam penelitian adalah sebagai berikut: E0 = 0% (kontrol); E1 = 1% (b/v); E2 = 2% (b/v); E3 = 3% (b/v); E4 = 4% (b/v); E5 = 5% (b/v); E6 = 6% (b/v).

Hasil yang diperoleh dihitung

menggunakan analisis keragaman untuk parameter derajat hidrolisis dan kadar protein hidrolisat. Hasil analisis keragaman dilakukan dengan membandingkan Ftabel pada uji 5% dengan dasar perbandingan sebagai berikut : jika Fhitung lebih besar dari pada F tabel 5% maka dinyatakan berpengaruh nyata. Jika F hitung lebih kecil dari pada Ftabel 5%, maka dinyatakan berpengaruh tidak nyata. Apabila berpengaruh nyata dilakukan uji lanjut Beda Jarak Nyata Duncan (BJND).

### Pembuatan Hidrolisat Protein (Hidayat 2005)

Pembuatan hidrolisat protein ikan dilakukan melalui reaksi hidrolisis enzimatis menggunakan enzim papain adalah sebagai berikut: Ikan patin segar yang telah mati selanjutnya disiangi dan di-*fillet* skinless, *Fillet* ikan kemudian direndam dengan air dingin dengan rasio daging dan air dingin 1:3 (b/v) pada suhu 5°C selama 40 menit dan diblender, selanjutnya daging dimasukan ke dalam beaker gelas dan dicampurkan dengan aquadest dan diaduk hingga homogen, perbandingan daging dan akuades (1:4). Enzim papain ditambahkan dengan konsentrasi 0%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5% dan 6% (b/v). Campuran tersebut diaduk dan pH diatur hingga mencapai pH 7, dengan HCl sebagai pengatur suasana asam dan NaOH sebagai pengatur suasana basa. Campuran kemudian dihidrolisis dengan cara diinkubasi dalam inkubator shaker pada suhu 55°C selama 6 jam, selama proses hidrolisis sampel diaduk setiap 60 menit. Hasil hidrolisis dimasukkan dalam waterbath pada suhu 90°C selama 20 menit untuk menonaktifkan enzim. Hasil kemudian disaring untuk mendapatkan filtrat. Filtrat kemudian disentrifugasi menggunakan sentrifuse dingin pada 3.500 rpm selama 15 menit. Hidrolisat protein ikan patin (*Pangasius pangasius*) yang dihasilkan kemudian dianalisis.

### Derajat hidrolisis (Hasnaliza *et al.* 2010)

Derajat hidrolisis dihitung berdasarkan persentase rasio trichloroacetic acid (TCA). Sebanyak 20 mL hidrolisat protein ditambahkan TCA 20% (b/v) sebanyak 20 mL. Campuran tersebut kemudian didiamkan selama 30 menit agar terjadi pengendapan, lalu disentrifugasi (kecepatan 7.800 x g, selama 15 menit). Supernatannya lalu dianalisis kadar nitrogennya menggunakan metode Kjeldahl. Derajat hidrolisis dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Hidrolisis} = \frac{\text{Nitrogen terlarut dalam TCA 20\% (b/v)}}{\text{Nitrogen total sampel}}$$

### Kadar Protein (AOAC 1995)

Sampel sebanyak 10 mL, dimasukkan ke dalam labu Kjeldahl 100 mL, selanjutnya ditambahkan 10 ml selenium dan 3 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat. Destruksi selama kurang lebih 1 jam sampai larutan jernih lalu didinginkan. Setelah dingin, ke dalam labu Kjeldahl ditambahkan 50 mL akuades dan 20 mL NaOH 40%, kemudian dilakukan proses destilasi dengan suhu destilator 100°C. Destilat dititrasi dengan HCl 0,1 N sampai terjadi perubahan warna merah muda. Volume titran dibaca dan dicatat. Larutan blanko dianalisis. Kadar protein dihitung dengan rumus sebagai berikut:  
%Kadar protein = %N x faktor konversi (6,25)

### Aktivitas Antioksidan Metode DPPH

Penghambatan dari hidrolisat protein ikan patin terhadap larutan radikal bebas DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) dengan pengukuran berdasarkan metode Shimada *et al.* (1992): 2 mL larutan sampel (perbandingan 1:1 v/v sampel/ etanol) ditambahkan ke dalam 2 mL dari 0,1 mM DPPH dilarutkan dalam 95% etanol. Campuran dikocok dengan vortex

dan sisihkan selama 30 menit pada suhu ruang. Absorbansi dari larutan hasil akan terbaca pada 517 nm. Nilai absorbansi yang rendah menunjukkan aktivitas scavenging DPPH yang lebih tinggi. Efek scavenging dipercepat dengan melihat hasil perhitungan persentase hambatan (% inhibisi) berdasarkan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{Inhibisi (penghambatan)} = \frac{A_o - A_s}{A_o} \times 100\%$$

Keterangan:

Ao: Absorbansi kontrol (blanko)

As: Absorbansi sampel

### **Analisis Berat Molekul dengan SDS-PAGE**

Penentuan berat molekul dilakukan menggunakan SDS PAGE (*Sodium Dodecil Sulphate Polyacrilamide Gel Electrophoresis*) (Laemmli 1970). Gel terdiri dari dua jenis, yaitu 8% gel pemisah dan 4% gel penahan. Pewarnaan yang digunakan dengan silver staining yaitu: gel direndam dalam larutan fikasasi (metanol 25% dan asam asetat 12%) selama 1 jam kemudian direndam dalam etanol 50% selama 20 menit, kemudian diganti dengan etanol 30% selama 2 x 20 menit, larutannya diganti dengan enhancer (larutan  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 0.35\text{H}_2\text{O}$ ) kemudian dicuci dengan akuadestilata, setelah dicuci ditambahkan larutan silver nitrat selama 30 menit kemudian dicuci lagi dengan akuadestilata 2 x 20 detik dan ditambahkan larutan developer (campuran  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  dan formaldehida) dan terakhir dengan larutan fikasasi.

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

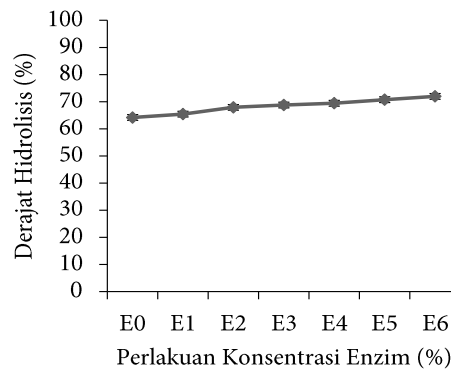
#### **Derajat Hidrolisis**

Selama proses hidrolisis terjadi pemutusan ikatan peptida pada protein oleh enzim proteolitik. Persentase ikatan peptida yang terlepas akibat proses hidrolisis dinyatakan dengan derajat hidrolisis. Derajat hidrolisis dalam proses

hidrolisis protein ikan patin ditentukan dengan metode soluble SN-TCA. Menurut Rutherford (2010), prinsip pengukuran derajat hidrolisis dengan metode SN-TCA adalah pengukuran kadar nitrogen yang terlarut dalam larutan trichloroacetic acid (TCA), setelah komponen yang tidak terlarut mengalami pengendapan akibat proses sentrifuge. Keuntungan dari penggunaan metode SN-TCA adalah proses analisisnya yang relatif lebih cepat dan praktis dibandingkan metode lainnya. Hasil pengukuran derajat hidrolisis hidrolisat protein ikan patin dapat dilihat pada Gambar 1.

Gambar 1 memperlihatkan bahwa persentase derajat hidrolisis yang didapat meningkat dengan meningkatnya konsentrasi enzim yang digunakan. Derajat hidrolisis yang semakin tinggi dengan semakin tinggi konsentrasi enzim menunjukkan bahwa proses hidrolisis protein yang berlangsung semakin baik. Menurut Hasnaliza *et al.* (2010), peningkatan derajat hidrolisis disebabkan oleh peningkatan peptida dan asam amino yang terlarut dalam TCA akibat dari pemutusan ikatan peptida selama hidrolisis protein.

Berdasarkan analisis keragaman memperlihatkan bahwa konsentrasi enzim memberikan pengaruh nyata terhadap derajat hidrolisis yang dihasilkan ( $p > 0,05$ ). Hasil uji lanjut Beda Jarak Nyata Duncan (BJND) menunjukkan bahwa perlakuan E0 (konsentrasi enzim papain 0%) dengan E1 (konsentrasi papain 1%) tidak berbeda nyata, perlakuan E0 dan E1 berbeda nyata dengan perlakuan lainnya. Perlakuan E5 (konsentrasi enzim papain 5%) dan E6 (konsentrasi enzim papain 6%) tidak berbeda nyata yang menunjukkan penggunaan enzim 6% menghasilkan derajat hidrolisis yang sama penggunaan dengan enzim 5%. Nurhayati *et al.* (2013) menyatakan bahwa semakin besar konsentrasi enzim papain



Gambar 1 Derajat hidrolisis hidrolisat protein ikan patin dengan konsentrasi papain yang berbeda. (E0= 0%, E1= 1%, E2= 2%, E3= 3%, E4= 4%, E5= 5%, E6= 6%).

yang ditambahkan, nilai derajat hidrolisis protein juga semakin besar, namun pada konsentrasi tertentu nilai derajat hidrolisis cenderung tetap atau tidak mengalami perubahan yang signifikan (Nurhayati *et al.* 2013). Pada hidrolisat protein ikan patin hanya difokuskan untuk mengamati pengaruh perbedaan konsentrasi enzim saja, sedangkan faktor lain dikontrol untuk tetap stabil seperti penggunaan suhu hidrolisis optimum 55°C, waktu hidrolisis 6 jam dan konsentrasi substrat yang sama banyak yaitu daging/akuades (1:4). Penelitian sebelumnya

Derajat hidrolisis terbaik didapatkan dari perlakuan konsentrasi enzim 6% yaitu sebesar 71,98%. Penelitian sebelumnya, Nurhayati *et al.* (2013) melakukan hidrolisis jeroan ikan tongkol menggunakan enzim papain didapatkan konsentrasi enzim terbaik 0,26% (b/v). Hidrolisis jeroan ikan kakap putih menggunakan enzim papain didapatkan konsentrasi enzim terbaik pada konsentrasi 1,5% (Nurhayati *et al.* 2014).

### Antioksidan dengan Metode DPPH

Metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) digunakan secara luas untuk percobaan kemampuan komponen dalam menangkap senyawa radikal bebas atau donor hidrogen, dan menentukan aktivitas antioksidan makanan. Metode

DPPH merupakan metode yang sederhana, cepat dan murah untuk penapisan aktivitas penangkap radikal beberapa senyawa. Metode DPPH dapat digunakan untuk sampel padatan atau cairan dan tidak spesifik untuk komponen antioksidan tertentu. Oleh sebab itu, metode DPPH paling sering digunakan dibandingkan metode lainnya. Radikal bebas DPPH dapat ditunjukkan pada absorbansi maksimum 517 nm dalam etanol maupun metanol.

Pengaruh antioksidan pada penghambatan radikal bebas DPPH dikarenakan kemampuan mendonorkan hidrogen (Binsan *et al.* 2008). Menurut Jia *et al.* (2010), ketika radikal bebas DPPH berjumpa dengan substansi pendonor proton sebagai antioksidan, radikal ditangkap dan nilai absorbansi akan berkurang (menurun). Nilai absorbansi yang didapat maka dapat dihitung nilai persen penghambatan radikal bebas DPPH, semakin besar persen penghambatan maka aktivitas antioksidan semakin tinggi. Persen penghambatan radikal bebas DPPH hidrolisat protein ikan patin dapat dilihat pada Gambar 2.

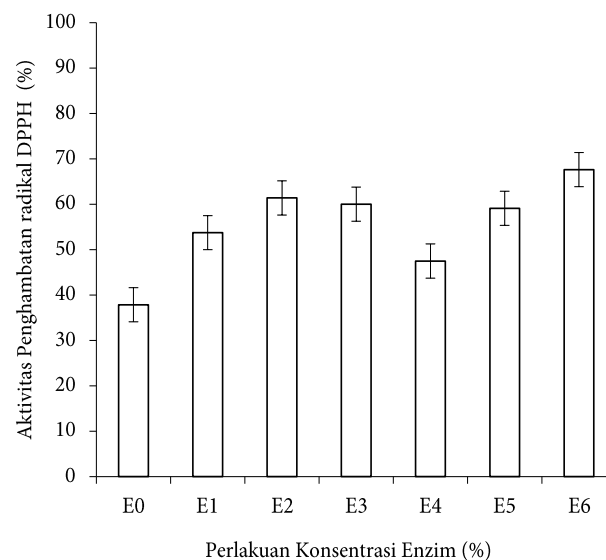
Gambar 2 menunjukkan persen penghambatan yang dihasilkan berkisar antara 37,85%-67,62%. Nilai persen penghambatan terendah terdapat pada perlakuan E0 (konsentrasi enzim papain

0%) yaitu sebesar 37,85% dan tertinggi pada perlakuan E6 (konsentrasi enzim papain 6%) sebesar 67,62%. Menurut Molyneux (2004), suatu senyawa dapat dikatakan memiliki aktivitas antioksidan apabila senyawa tersebut mampu mendonorkan atom hidrogennya ditandai dengan perubahan warna ungu menjadi warna kuning pucat.

Secara umum semua hidrolisat yang mengandung peptida atau protein dapat mendonorkan proton dan dapat bereaksi dengan senyawa radikal untuk mengubah menjadi senyawa yang lebih stabil. Suatu senyawa dikatakan memiliki aktivitas antioksidan apabila saat diujikan mampu menangkap radikal bebas dari DPPH. Larutan DPPH berwarna ungu, namun ketika direaksikan dengan hidrolisat protein ikan patin sebagai antioksidan warna larutan berubah menjadi kuning terang. Perubahan warna ini menunjukkan bahwa elektron yang tidak berpasangan pada radikal bebas DPPH telah berpasangan. Interaksi antara sampel hidrolisat protein ikan patin yang mendonorkan proton pada radikal bebas DPPH, sehingga radikal tersebut menjadi

netral dan tidak lagi bersifat radikal. Perubahan tersebut menunjukkan bahwa hidrolisat protein ikan patin memiliki sifat antioksidan.

Pada Gambar 2 menunjukkan bahwa perbedaan perlakuan konsentrasi enzim papain menghasilkan persen penghambatan radikal bebas DPPH yang berbeda. Ini mengindikasikan bahwa terdapatnya hubungan antara aktivitas antioksidan dengan persentase enzim yang digunakan pada proses hidrolisis. Penambahan konsentrasi enzim, nilai persen inhibisi (persen penghambatan) meningkat sampai konsentrasi enzim 4%. Peningkatan konsentrasi enzim akan sejalan dengan peningkatan jumlah peptida dan asam amino bebas. Ketika penggunaan enzim jumlahnya ditingkatkan maka jumlah peptida dan asam amino bebas yang dihasilkan pada produk hidrolisat juga akan meningkat, sehingga nilai antioksidan yang dihasilkan juga akan ikut meningkat. Hanani *et al.* (2005), menyatakan bahwa persentase penghambatan (persen inhibisi) terhadap aktivitas radikal bebas akan ikut meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak.



Gambar 2 Persen penghambatan radikal bebas DPPH pada hidrolisat protein ikan patin dengan konsentrasi enzim yang berbeda (E0= 0%, E1= 1%, E2= 2%, E3= 3%, E4= 4%, E5= 5%, E6= 6%).

Pada perlakuan E4 dan E5 terjadi penurunan nilai persen penghambatan, diduga bahwa peptida yang dihasilkan dari hidrolisat protein ikan patin yang berperan sebagai antioksidan tidak banyak mendonorkan hidrogen sehingga nilai persen penghambatannya cenderung menurun jika dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Bordbar *et al.* (2013) juga menambahkan bahwa ukuran peptida dan kelarutannya, komposisi asam amino, untaian dan banyaknya asam amino bebas merupakan kunci yang menentukan kapasitas penangkapan radikal DPPH.

### Kadar Protein

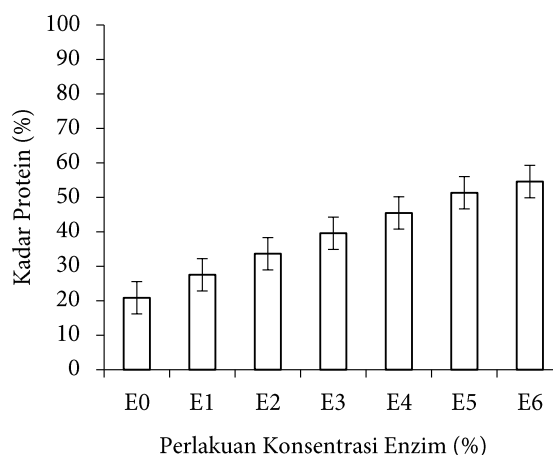
Protein merupakan makromolekul yang terbentuk dari asam-asam amino yang berikatan peptida. Protein berfungsi sebagai bahan bakar dalam tubuh, serta berperan sebagai zat pembangun dan pengatur. Pengukuran protein pada bahan pangan digunakan untuk mengetahui kemampuan bahan pangan sebagai sumber protein atau tidak. Grafik kadar protein hidrolisat protein ikan patin dapat dilihat pada Gambar 3.

Gambar 3 memperlihatkan kadar protein yang dihasilkan berkisar antara 20,86 mg/ml–54,47 mg/mL. Nilai protein terendah terdapat pada perlakuan E0

(konsentrasi enzim papain 0%) yaitu sebesar 20,86 mg/mL dan tertinggi pada perlakuan E6 (konsentrasi enzim papain 6%) sebesar 54,47 mg/mL. Protein yang dikandung oleh produk hidrolisat ini adalah protein terlarut, sedangkan protein tidak terlarut sudah terbuang pada saat sentrifuse.

Selama hidrolisis terjadi konversi protein yang bersifat tidak larut menjadi senyawa nitrogen yang bersifat larut, selanjutnya terurai menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana, seperti peptida-peptida, asam amino dan amonia sehingga mudah diserap oleh tubuh. Kadar protein hidrolisat protein ikan patin mengalami peningkatan disebabkan peningkatan konsentrasi enzim yang digunakan sehingga kandungan nitrogen terlarut juga mengalami peningkatan. Hasnaliza *et al.* (2010) menyatakan bahwa konsentrasi enzim proteolitik yang semakin meningkat dalam proses hidrolisis akan menyebabkan peningkatan kandungan nitrogen terlarut dalam hidrolisat protein ikan.

Berdasarkan analisis keragaman konsentrasi enzim memberikan pengaruh nyata terhadap nilai protein yang dihasilkan ( $p>0,05$ ). Hasil uji lanjut Beda Jarak Nyata Duncan (BJND) menunjukkan



Gambar 3 Kadar protein hidrolisat protein ikan patin dengan konsentrasi enzim yang berbeda (E0= 0%, E1= 1%, E2= 2%, E3= 3%, E4= 4%, E5= 5%, E6= 6%).

bahwa semua perlakuan konsentrasi enzim papain berbeda nyata. Penambahan konsentrasi enzim menyebabkan protein meningkat hal ini disebabkan enzim itu sendiri adalah protein.

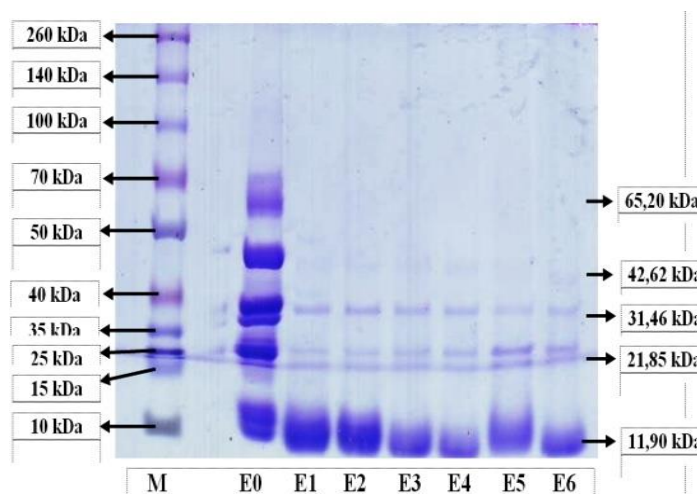
### Berat Molekul dengan Metode SDS-PAGE

Metode yang paling umum digunakan untuk memisahkan protein adalah dengan cara elektroforesis menggunakan discontinuous polyacrylamide gel sebagai medium penyangga dan sodium dodecyl sulfate (SDS) untuk mendenaturasi protein. Metode ini disebut *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS PAGE). Pita-pita protein hasil elektroforesis SDS PAGE pada hidrolisat protein ikan patin dapat dilihat pada Gambar 4.

Hasil yang didapat pada Gambar 4. memperlihatkan bahwa perlakuan E0 (Konsentrasi enzim 0%) menghasilkan jumlah pita (*band*) protein yang lebih banyak dan lebih tinggi dibandingkan perlakuan lainnya. Jumlah pita (*band*) protein yang didapat adalah 7 pita dengan berat molekul yang didapat masing-masing adalah 65,20 kDa, 42,62 kDa,

31,46 kDa, 27,86 kDa, 27,85 kDa, 19,35 kDa dan 11,90 kDa. Sedangkan untuk perlakuan lainnya (Konsentrasi enzim 1%, 2%, 3%, 4%, 5% dan 6%), menghasilkan 4 pita (*band*) protein dengan berat molekul 42,62 kDa, 31,46 kDa, 27,85 kDa dan 11,90 kDa. Ini memperlihatkan bahwa penggunaan enzim papain efektif dalam memutus ikatan peptida protein menjadi peptida dan asam amino dengan berat molekul rendah.

Menurut Belkaaloul *et al.* (2010), selama proses hidrolisis protein oleh enzim proteolitik berlangsung terjadi memecah protein menjadi fraksi-fraksi protein yang lebih kecil. Pada perlakuan E0 (konsentrasi enzim 0%) jumlah pita (*band*) protein yang didapat lebih banyak dan berat molekulnya lebih tinggi dibandingkan perlakuan lainnya, dikarenakan tidak adanya penambahan enzim (kontrol) sehingga protein tidak terpecah menjadi fraksi-fraksi yang lebih kecil (peptida dan asam-asam amino). Menurut Damodaran (1996), hidrolisis protein enzimatis menggunakan enzim protease umumnya hidrolisat protein yang dihasilkan mengandung peptida dengan bobot molekul rendah yang terdiri atas dua hingga empat asam amino.



Gambar 4 Pita-pita protein hasil elektroforesis SDS-PAGE pada hidrolisat protein ikan patin dengan perlakuan konsentrasi enzim yang berbeda (E0= 0%, E1= 1%, E2= 2%, E3= 3%, E4= 4%, E5= 5%, E6= 6%).



Hasil penelitian Angraini (2013) mengenai hidrolisat kolagen dari kulit ikan patin (*Pangasius pangasius*) dengan enzim papain menghasilkan berat molekul rendah berkisar 13,84-23,08 kDa. Pada hidrolisat protein dari tulang ikan patin menggunakan enzim papain juga menghasilkan berat molekul rendah berkisar 11,90-65,20 kDa. Hal ini memperlihatkan bahwa penggunaan enzim papain efektif dalam memutus ikatan peptida protein kompleks menjadi peptida-peptida dan asam-asam amino dengan berat molekul rendah.

### KESIMPULAN

Hidrolisat protein ikan patin menggunakan enzim papain memiliki derajat hidrolisis terbaik terdapat pada perlakuan menggunakan konsentrasi enzim papain 6%. Kadar protein dan persen penghambatan terhadap radikal DPPH hidrolisat mengalami peningkatan dengan meningkatnya konsentrasi enzim. Berat molekul hidrolisat protein ikan patin dengan menggunakan enzim papain memiliki berat molekul yang berkisar antara 11,90 kDa - 65,20 kDa.

### DAFTAR PUSTAKA

- Angraini S. 2013. Hidrolisis kolagen dari kulit dan tulang ikan patin (*Pangasius pangasius*) dengan enzim papain serta pengujian aktivitas antioksidan produk hidrolisat yang dihasilkan. [Skripsi]. Indralaya: Program Studi Teknologi Hasil Perikanan. Fakultas Pertanian. Universitas Sriwijaya.
- Belkaaloul A, A Checroun, A.I Ait-Abdesalam, D Saidi, and O Kheroua. 2010. Growth, acidification & proteolysis performance of two co-cultures (*Lactobacillus plantarum*-*Bifidobacterium longum* and *Streptococcus thermophilus bifidobacterium longum*). *African Journal of Biotechnology* 9(10):1463-1469.
- Binsan W, Benkalul S, Visessangum W, Roytrakul S, Tanaka M, Kishimura H. 2008. Antioxidative activity of Mungon, an extract paste, from the cephalothorax of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Food Chemistry* 106:185-193.
- Bordbar S, Ebrahimpour A, Hamid AA, Saari N. 2013. The Improvement of the Enogenous Antioxidant Property of Stone Fish (*Actinopyga lecanora*) Tissue Using Enzymatic Proteolysis. *Journal of Food Science* 9:15-18.
- Carsen CU, Rasmussen KT, Kjeldsen KK, Westergaard P, Skibsted LH. 2003. Pro- and antioxidative activity of protein fractions from pork (*Longissimus dorsi*). *European Food Research and Technology* 217:195-200.
- Damodaran S. 1996. Fuctional properties. Di dalam: Nakai S, Modler H.W (editor). Food protein: Properties and characterization. New York: UCH Publisher.
- Farag RS, Badel AZMA, Hewdel FM, El-Baroty GSA. 1989. Antioxidant activity of some species essential oils on linoleic oxidation in aqueous media. *Journal of the American of Oil Chemists' Society* 66:792-799
- Foh MBK, Tamara MT, Amadou I, Foh BM, Wenshui X. 2011. Chemical and physicochemical properties of tilapia (*Oreochromis niloticus*) fish protein hydrolysate and concentrate. *Journal of Food Biochemistry* 10: 1-15.
- Gesualdo AML, Li-Chan ECY. 1999. Functional properties of fish protein hydrolysate from herring (*Clupea harengus*). *Journal Food Science* 64:1000-1004.
- Hanani E, Mun'im A, dan Sekarini R. 2005. Identifikasi Senyawa Antioksidan dalam Spons *Callispongia* sp. dari Kepulauan Seribu. *Majalah Ilmu Kefarmasian* 2(3):127-133.
- Hasnaliza H, Maskat MY, Wan AWM,

- Mamot S. 2010. The effect of enzyme concentration, temperature and incubation time on nitrogen content and degree of hydrolysis of protein precipitate from cockle (*Anadara granosa*) meat wash water. *International Food Research Journal* 17:147-152.
- Hidayat T. 2005. Pembuatan Hidrolisat Protein dari Ikan Selar Kuning (*Caranx leptolepis*) dengan Menggunakan Enzim Papain. [Skripsi]. Bogor: Program Studi Teknologi Hasil Perikanan. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor.
- Je JY, Qian ZJ, Lee SH, Byun HG, Kim SK. 2007. Purification and Characterization of an antioxidant peptide obtained from backbone tuna protein by enzymatic hydrolysis. *Process Biochemistry* 42: 840-846.
- Jia J, Zhou Y, Chen A, Li Y, dan Zhenh G. 2010. Enzymatic Hydrolysis of Allaska Pollack (*Theragra chalcogramma*) Skin and Antioxidant Activity of The Result Hydrolysate. *Journal of the science of Food and Agriculture* 90: 635-640.
- Jun SY, Park PJ, Jung WK, Kim SK. 2004. Purification and characterization of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysate of Yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein. *European Journal of Food Research and Technology* 219: 20-26.
- Kim SK, Kim Y, Byun HG, Nam KS, Joo DS, Shahidi F. 2001. Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelatin hydrolysate of Allaska Pollack skin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49:1984-1989.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Molyneux P. 2004. The Use Of The Stable Free Radical Dyhenylpicrylhydrazil (DPPH) For Estimating Antioxidant Activity. *Songklanakarinn Journal of Science and Technology* 26:211-219.
- Nurhayati T, Desniar, Made S. 2013. Pembuatan pepton secara enzimatis menggunakan bahan baku jeroan ikan tongkol. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia* 16(1):1-11.
- Nurhayati T, Salamah E, Choifah, Nugraha R. 2014. Optimasi proses pembuatan hidrolisat jeroan ikan kakap putih. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia* 17(1):42-52.
- Park PJ, Jung WK, Nam KS, Shahidi F, Kim SK. 2001. Purification and characterization of antioxidative peptides from protein hydrolysate of lechitin-free egg yolk. *Journal of the American of Oil Chemists' Society* 78:651-656.
- Rutherford SM. 2010. Methodology for determining degree of hydrolysis of protein hydrolysates: a review. *Journal of AOAC International* 93(5):1515-1522.
- Samaranayaka AGP dan Li-Chan ECY. 2011. Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. *Journal of Functional Food* 3:229-254.
- Shimada K, Fujikawa K, Yahara K, Nakamura T. 1992. Antioxidative properties of Xhantan on the antioxidation of soy bean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40: 945-948.
- Wanita A, Lorenz K. 1996. Antioxidant potential of 5-N-pentadecylresorcinol. *Journal of Food Process Preservative* 20:417-429.