

HIDROLISIS IKAN BERNILAI EKONOMI RENDAH SECARA ENZIMATIS MENGUNAKAN PROTEASE BIDURI

[Enzymatic Hydrolysis of the Low Economic Value Fishes using Biduri's Protease]

Yuli Witono^{1)*}, Iwan Taruna²⁾, Wiwik Siti Widrati¹⁾ dan Amelia Ratna¹⁾

¹⁾Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember
Jl. Kalimantan 1 Jember, Jawa Timur, Indonesia 68121

²⁾Laboratorium Enjiniring Hasil Pertanian, Jurusan Teknik Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember
Jl. Kalimantan 1 Jember, Jawa Timur, Indonesia 68121

Diterima 20 November 2013 / Disetujui 08 Agustus 2014

ABSTRACT

Fish protein hydrolyzate is a product obtained from the decomposition of fish proteins into short-chain compounds due to the hydrolysis process either by enzymes, acids, or bases. The purpose of this study was to optimize the production of fish protein hydrolyzate from the low economic value fishes including 'bibisan' (*Apogon albimaculosus*), 'baji-baji' (*Platycephalidae cymbacephalus*), and the 'lidah' (*Cynoglossus lingua*) taken from Talango Island, Madura. The production of fish protein hydrolyzate used enzymatic hydrolysis by biduri's (*Calotropis gigantea*) protease. The concentrations of biduri's protease varied (0, 0.7, 1.4, and 2.1 Unit/g) and at various hydrolysis times (0, 1.5, and 3 h). The experimental design was a Completely Randomized Design with two factors which were carried out in triplicates. The results showed that interactions between the protease concentrations and times significantly affected (at 5% level test) the soluble proteins, maillard products, and the level of rancidity measured as thiobarbituric acid (TBA). The best fish hydrolyzate product based on the soluble protein parameter was resulted from 2.1 Unit/g biduri's protease and hydrolysis time of 1.5 h. The characteristics of the hydrolyzate were containing 3.51% of soluble proteins, having maillard value of 0.63, and rancidity levels of 12.21 mmol TBA/kg.

Keywords: biduri protease, hydrolyzate, low economic value fishes, soluble protein

ABSTRAK

Hidrolisat protein ikan merupakan produk yang dihasilkan dari penguraian protein ikan menjadi senyawa-senyawa berantai pendek karena adanya proses hidrolisis baik oleh enzim, asam, maupun basa. Tujuan penelitian ini adalah melakukan optimasi produksi hidrolisat protein dari ikan yang bernilai ekonomi rendah yang didapat dari Pulau Talango, Madura. Ikan tersebut meliputi 'bibisan' (*Apogon albimaculosus*), 'baji-baji' (*Platycephalidae cymbacephalus*), dan 'lidah' (*Cynoglossus lingua*). Produksi hidrolisat protein dari ikan ini dilakukan dengan hidrolisis menggunakan enzim protease dari tanaman biduri (*Calotropis gigantea*). Perlakuan dengan protease dari tanaman biduri dilakukan pada berbagai konsentrasi enzim (0; 0.7; 1.4; and 2.1 Unit/g) dan waktu hidrolisis (0; 1.5; dan 3 jam). Rancangan percobaan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap dengan dua perlakuan dan diulang sebanyak tiga kali. Hasil penelitian menunjukkan bahwa interaksi konsentrasi protease biduri dan lama hidrolisis berpengaruh nyata ($\alpha=5\%$) terhadap protein terlarut, nilai produk maillard dan tingkat ketengikan. Hidrolisat terbaik berdasarkan kelarutan protein diperoleh dari perlakuan 2.1 Unit protease biduri/g dan lama hidrolisis 1.5 jam dengan karakteristik hidrolisat meliputi kadar protein terlarut 3.51%; nilai produk maillard 0.63; dan nilai TBA (tingkat ketengikan) 12.21 (mmol/kg).

Kata kunci: hidrolisat, ikan bernilai ekonomi rendah, protease biduri, protein terlarut

PENDAHULUAN

Ikan sebagai salah satu bahan pangan merupakan sumber protein hewani yang tinggi. Protein merupakan komponen gizi terbesar yang terdapat dalam daging ikan (30–80%), sehingga ikan merupakan sumber protein hewani yang potensial. Ikan segar merupakan ikan yang baru saja ditangkap, belum

disimpan, atau diawetkan dan mempunyai mutu yang tidak berubah serta tidak mengalami kerusakan (SNI 01-2729.3-2006). Ikan segar mudah mengalami kerusakan setelah ditangkap yang akan diikuti oleh proses pembusukan. Perubahan pada ikan setelah ditangkap dan selama penyimpanan meliputi aktivitas mikroba, enzim *autolysis* dan reaksi kimia yang dapat dijadikan indikator mutu. Kemunduran mutu ikan juga dapat dideteksi dengan pengujian secara kimiawi seperti kandungan TVB (*total volatile base*), TBA

*Penulis Korespondensi:
E-mail: yuliwitono.ftp@unej.ac.id; No. Hp: 081336700946

(thiobarbituric acid), TMA (*trimethyl amine*), dan amina biogenik, terutama histamin.

Kerusakan ikan ini menyebabkan mutu ikan menjadi rendah, bahkan dari penanganan yang kurang tepat atau sortasi ikan untuk keperluan industri pengolahan ikan, dihasilkan banyak sekali ikan yang bermutu rendah. Apalagi sewaktu panen raya, jumlah ikan yang inferior (bernilai ekonomi rendah) berlimpah dan tidak dapat tertangani secara optimal. Beberapa jenis ikan inferior yang potensial untuk dimanfaatkan sebagai protein fungsional dalam bentuk hidrolisat protein ikan terdapat di Pulau Talango, Madura yang meliputi 'bibisan' (*Apogon albimaculosus*), 'baji-baji' (*Platycephalidae cymbacephalus*), dan 'lidah' (*Cynoglossus lingua*). Hidrolisis enzimatis protein ikan potensial sebagai sumber komponen bioaktif peptida yang belum banyak dikembangkan. Hidrolisat protein ikan (HPI) telah terbukti memiliki efek hipokolesterolemik (Wergedahl *et al.* 2004), antioksidan (Je *et al.* 2008), dan anti-inflamasi (Marchbank *et al.* 2009). Salah satu contoh pemanfaatan HPI adalah untuk pembuatan pepton yang digunakan sebagai media pertumbuhan mikroorganisme dan dibutuhkan dalam perkembangan bioteknologi (Wijayanti, 2009). Hidrolisat protein pangan memiliki aplikasi yang luas sebagai komponen gizi, industri makanan, kesehatan dan kosmetik (Radha *et al.* 2008). Hidrolisat protein juga dapat digunakan untuk meningkatkan rasa makanan.

HPI dapat diproduksi secara kimia dan enzimatis. Hidrolisis enzimatis merupakan pilihan metode paling aman dan lebih menguntungkan dibanding metode kimiawi, karena metode ini menghasilkan asam-asam amino bebas dan peptida dengan rantai pendek yang bervariasi. Produk tersebut mempunyai rentang kegunaan yang lebih luas dalam industri pangan (Kunst, 2000). Salah satu enzim protease yang dapat digunakan untuk pembuatan HPI adalah protease dari tanaman biduri (*Calotropis gigantea*). Ekstrak dari tanaman biduri baik dari bagian getah, batang maupun daun potensial sebagai sumber enzim protease (Witono *et al.* 2007). Hasil karakterisasi enzim protease dari tanaman biduri, berdasarkan spesifikasinya, mengindikasikan secara kuat termasuk dalam golongan eksopeptidase (Witono dan Kang, 2010) yang sesuai untuk aplikasi dalam pembuatan hidrolisat protein *flavor enhancer*.

Penelitian HPI dari ikan bernilai ekonomi rendah dari pulau Talango Madura menggunakan protease biduri hingga saat ini belum pernah dilakukan. Dalam penelitian ini dilakukan proses produksi secara enzimatis dengan variasi konsentrasi enzim dan lama hidrolisis untuk menentukan perlakuan terbaik dengan melakukan analisa pada kadar protein terlarut, absorbansi nilai produk maillard, warna dan tingkat ketengikan dari hidrolisat protein ikan yang dihasilkan untuk menentukan perlakuan terbaik.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan utama yang digunakan adalah empat jenis ikan bernilai ekonomi rendah meliputi 'bibisan' (*Apogon albimaculosus*), 'baji-baji' (*Platycephalidae cymbacephalus*), dan 'lidah' (*Cynoglossus lingua*) yang didapatkan dari pulau

Talango, Madura, Jawa Timur. Enzim protease biduri diperoleh dari ekstrak getah tanaman biduri melalui metode Witono *et al.* (2006) dengan aktivitas spesifik 0.14 Unit/mg. Bahan kimia yang digunakan berspesifikasi Pro Analysis (pa) yang meliputi *reagen mix* Lowry, folin, TBA, iso butanol, benzene, H₂SO₄, NaOH, dan aquades yang sebagian besar bermerk (Merck) Jerman.

Pengambilan dan preparasi sampel

Ikan bernilai ekonomi rendah yang digunakan adalah ikan segar yang diperoleh dari hasil tangkapan nelayan di pulau Talango Madura. Ikan diidentifikasi jenisnya di Laboratorium Taksonomi, Fakultas Perikanan, Universitas Brawijaya Malang, kemudian dihilangkan kepala, kotoran, kulit dan tulangnya untuk mendapatkan *fillet* ikan.

Produksi hidrolisat protein ikan

Fillet ikan sebanyak 100 g dengan komposisi ikan bibisan: baji-baji: lidah = 1 : 1 : 1, ditambah dengan aquades dengan perbandingan bahan: aquades = 1 : 2. Larutan yang didapat kemudian dikondisikan pada pH 7.0 (pH meter merk *Jen Way type* 3320, Jerman) dan ditambah enzim protease biduri pada berbagai konsentrasi (0; 0.7; 1.4; dan 2.1 Unit/g). Inkubasi dilakukan dalam penangas pada suhu 55°C selama 0; 1.5; dan 3 jam. Kemudian sampel dididihkan menggunakan penangas listrik (*Gerhardt*) pada suhu 100°C selama 10 menit untuk menghentikan proses hidrolisis. Sampel dikeringkan pada alat pemanas (*Memmert*) suhu 60°C selama ±18 jam. Hidrolisat kering yang didapat kemudian dihaluskan hingga ukuran 80 mesh.

Parameter pengamatan

Variabel yang diamati meliputi warna metode Hutching (1994) menggunakan *colour reader* (Minolta) yang menghasilkan nilai atribut L, a, dan b. Nilai °Hue dihitung dari nilai a dan b yang diperoleh menggunakan persamaan °Hue = arc tan (a/b). Kadar protein terlarut menggunakan metode Lowry (1951 dalam Walker, 2002) dengan modifikasi, tingkat ketengikan menggunakan metode TBA dengan modifikasi (Subagio *et al.* 2002), dan nilai produk maillard (Hofmann *et al.* 1999). Analisa data menggunakan analisa ragam (ANOVA) dan jika terdapat perbedaan nyata dilanjutkan dengan uji Tukey pada taraf 5% untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kadar protein terlarut

Optimasi perlakuan dalam penelitian ini dilakukan berdasarkan analisis kadar protein terlarut Uji lanjut Tukey (Tabel 1) menunjukkan bahwa hidrolisis 0 jam menggunakan protease biduri 0.7 Unit/g tidak terdapat perbedaan nyata, sedangkan perbedaan nyata ditunjukkan pada konsentrasi enzim 1.4 Unit/g dan 2.1 Unit/g. Perlakuan 2.1 Unit/g menghasilkan kadar protein terlarut tertinggi yang menunjukkan perbedaan nyata jika dibandingkan perlakuan lainnya, sedangkan penambahan enzim 0.7 Unit/g dan 1.4 Unit/g tidak menunjukkan perbedaan nyata. Hal ini mengindikasikan bahwa protease biduri dapat bekerja pada suhu ruang sesaat setelah

ditambahkan pada substrat, walaupun kondisi optimal kerjanya pada suhu 55°C. Protease biduri termasuk dalam golongan eksopeptidase yang terdiri dari karboksi-ekso-peptidase yang memotong peptida dari arah gugus karboksil terminal dan amino-eksopeptidase dari gugus terminal (Mubarik *et al.* 2000). Hidrolisis menggunakan konsentrasi enzim 2.1 Unit/g dan waktu inkubasi 1.5 jam merupakan perlakuan terbaik dengan kadar kelarutan protein tertinggi sebesar 3.509%. Penelitian lain (Koeswardani *et al.* 2011) dalam pembuatan ikan rucah menggunakan enzim papain 5% dan waktu inkubasi 1 jam menghasilkan kadar protein terlarut sebesar 12.53%.

Enzim protease mampu menghidrolisis ikatan peptida pada protein. Faktor-faktor yang mempengaruhi proses hidrolisis meliputi rasio enzim dan substrat, perbedaan jenis enzim, pH, waktu dan suhu hidrolisis (Dumay *et al.* 2006). Hidrolisis protein ikan menggunakan protease dari tanaman dan mikroba lebih sesuai untuk menghasilkan HPI jika dibandingkan protease dari hewan (Bhaskar *et al.* 2008). Enzim protease biduri diindikasikan secara kuat termasuk dalam golongan eksopeptidase yang mampu menghasilkan fragmen peptida dan asam amino sehingga sesuai untuk produksi *flavour enhancer* (Witono dan Kang, 2010). Hidrolisis menggunakan enzim protease lainnya dari golongan endopeptidase hanya mampu menghasilkan fragmen peptida (Kaneda *et al.* 1997) sehingga kurang sesuai digunakan dalam produksi *flavour enhancer*.

Tabel 1. Kadar protein terlarut pada HPI dari ikan bernilai ekonomi rendah dengan konsentrasi enzim protease biduri dan waktu hidrolisis yang berbeda

Waktu (jam)	Konsentrasi Enzim (Unit/g)	Protein Terlarut (%)
0	0	2.244±0.009 ^a
0	0.7	2.405±0.299 ^a
0	1.4	3.017±0.045 ^{bc}
0	2.1	3.034±0.082 ^{bc}
1.5	0	2.384±0.211 ^a
1.5	0.7	3.046±0.040 ^{bc}
1.5	1.4	3.248±0.047 ^{cd}
1.5	2.1	3.509±0.055 ^d
3	0	2.534±0.269 ^a
3	0.7	2.685±0.055 ^{ab}
3	1.4	3.261±0.246 ^{cd}
3	2.1	3.436±0.078 ^{cd}

Keterangan: *Huruf yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan nyata antar perlakuan berdasarkan hasil uji lanjut Tukey pada taraf 5%

Perubahan konsentrasi enzim protease biduri berbanding lurus dengan perubahan kadar protein terlarut dalam hidrolisat yang dihasilkan. Hal ini dikarenakan enzim protease mendegradasi protein menjadi peptida pendek dan asam amino yang mudah larut. Rasio enzim:substrat (konsentrasi enzim) berbanding lurus dengan derajat hidrolisa. Peningkatan enzim protease meningkatkan jumlah nitrogen terlarut dari hidrolisat selama proses hidrolisis (Wang *et al.* 2007). Dalam penelitian ini konsentrasi enzim terbesar (2.1 Unit/g) merupakan perlakuan terbaik dengan kadar protein terlarut tertinggi. Hal ini didukung oleh penelitian Bhaskar *et al.* (2008), yang menyebutkan bahwa enzim protease dari jenis *alcalase* dapat bekerja optimal menghidrolisis protein limbah jeroan pada konsentrasi 1,5% dan dinyatakan pada konsentrasi ini derajat hidrolisis memasuki

fase stasioner. Penelitian hidrolisis ikan rucah menggunakan enzim papain yang dilakukan oleh Koesoemawardani *et al.* (2011) mendapatkan kondisi optimal pada konsentrasi enzim 5%. Penggunaan enzim di atas jumlah optimal tidak memberi pengaruh terhadap kadar protein terlarut karena selama proses tidak ada penambahan substrat dan substrat yang tersedia sudah habis digunakan selama proses hidrolisis.

Kadar protein terlarut hidrolisat juga dipengaruhi oleh waktu hidrolisis. Hidrolisis pada saat 0 jam dilakukan untuk mengetahui pengaruh penambahan enzim sesaat setelah ditambahkan pada substrat. Hasil penelitian menunjukkan adanya peningkatan kadar protein terlarut dengan adanya peningkatan konsentrasi enzim. Hal ini mengindikasikan enzim protease biduri dapat bekerja pada suhu ruang sesaat setelah ditambahkan pada substrat. Peningkatan lama hidrolisis dari 0 jam ke 1.5 jam berpengaruh terhadap kenaikan kadar protein terlarut pada seluruh perlakuan. Haslaniza *et al.* (2010) menyatakan bahwa semakin lama waktu hidrolisis, aktivitas proteolisis meningkatkan degradasi protein semakin luas dan dihasilkan derajat hidrolisis yang lebih tinggi sehingga kadar protein terlarut semakin besar pula. Hal berbeda terjadi pada peningkatan lama hidrolisis dari 1.5 jam ke 3 jam yang menunjukkan penurunan yang tidak berbeda nyata, kecuali pada perlakuan konsentrasi enzim 0 Unit/g yang tetap menunjukkan adanya peningkatan. Penurunan kadar protein terlarut pada hidrolisis selama 3 jam diduga karena semakin lama hidrolisis, lebih banyak asam amino non polar terbentuk seperti glisin, alanin, valin, leusin, isoleusin dan prolin dari fragmen peptida-peptida larut air. Secara umum penambahan lama hidrolisis dari kondisi optimal tidak memberikan pengaruh terhadap nilai protein terlarut dalam hidrolisat karena selama proses tidak ada penambahan substrat dan substrat yang tersedia sudah habis digunakan (Koesoemawardhani *et al.* 2011).

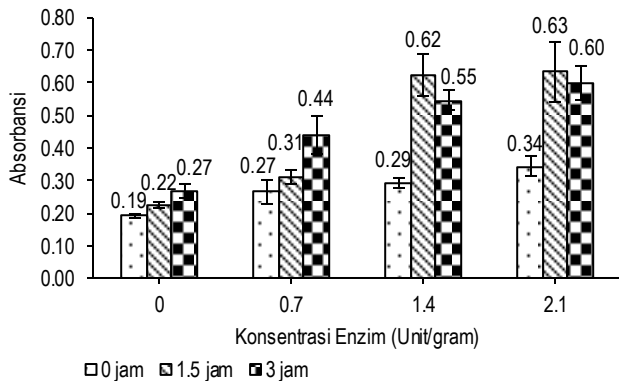
Kelarutan yang tinggi dari HPI pada berbagai pH dapat diaplikasikan pada produk pangan. Selain itu, hal ini mempengaruhi komponen fungsional HPI lainnya seperti sebagai pengemulsi dan komponen buih (Gbogouri *et al.* 2004). HPI yang didapat melalui hidrolisis enzimatis terkontrol memiliki komponen nutrisi yang baik seperti keseimbangan komposisi asam amino dan kelarutan yang tinggi, tetapi utamanya digunakan untuk nutrisi hewan (Nolsoe dan Undeland 2009).

Nilai produk maillard

Reaksi maillard (*browning non enzymatic*) merupakan reaksi antara gugus karbonil dan gugus amina primer yang melibatkan reaksi kondensasi (Miao dan Roos, 2004). Salah satu aplikasi produk maillard dalam bidang pangan adalah pembentukan *flavour* yang dihasilkan dari reaksi antara gula reduksi dan senyawa-senyawa amino untuk membentuk glikosamin (Mottram, 1998). Gugus amino residu lisin yang terikat pada peptida dan protein berperan penting dalam reaksi disebabkan kereaktifannya yang tinggi. Selain itu gugus α -amino terminal juga berperan dalam reaksi maillard.

Hasil penelitian menunjukkan konsentrasi protease biduri dan waktu hidrolisis berpengaruh nyata ($\alpha=0.05$) terhadap nilai absorbansi produk maillard HPI dari ikan bernilai ekonomi rendah (Gambar 1). Semakin besar konsentrasi protease biduri

dan semakin lama hidrolisis, maka nilai produk maillard dari HPI yang dihasilkan semakin tinggi. Hasil ini didukung oleh hasil penelitian Subagio *et al.* (2002) yang menunjukkan bahwa nilai absorbansi produk maillard dari hidrolisat tempe kedelai meningkat seiring dengan semakin lamanya waktu hidrolisis.



Gambar 1. Nilai produk maillard HPI dari ikan bernilai ekonomi rendah pada berbagai konsentrasi protease biduri dan lama hidrolisis. Nilai dinyatakan dalam rata-rata \pm standard deviasi

Lisin adalah jenis asam amino yang paling reaktif bereaksi dengan gula reduksi, sedangkan sistein adalah asam amino yang paling tidak reaktif. Residu lisin protein pada awal reaksi berikatan dengan gula reduksi membentuk senyawa turunan deoksiketosisil-lisin sebagai laktulosil-lisin. Pada tahap selanjutnya, senyawa laktulosil-lisin terdekomposisi menghasilkan pramelanoidin yang dapat bereaksi dengan asam amino lain pada rantai samping protein yang berakibat terhadap kerusakan beberapa jenis asam amino esensial dan terbentuknya ikatan silang antar rantai protein (Hurrell *et al.* 1979).

Assoumani *et al.* (1994) menyatakan bahwa jumlah asam amino yang berkurang selama berlangsungnya reaksi maillard juga dipengaruhi oleh jenis gulanya. Fruktosa adalah gula yang sangat reaktif, sehingga memberikan efek kehilangan asam amino yang cukup besar dibandingkan jenis gula lainnya. Setelah fruktosa, sifat kereaktifan gula selanjutnya dari yang terbesar berturut-turut adalah glukosa, galaktosa, mannose, arabinose, xilosa dan ribose.

Warna

Perbandingan nilai a dan b dapat diinterpretasikan dalam nilai $^{\circ}\text{Hue}$ [$\arctan(b/a)$]. Nilai $^{\circ}\text{Hue}$ dari semua perlakuan (Tabel 2) antara 74.1-74.7 yang termasuk kategori warna kuning kemerahan. dan tidak terdapat perbedaan nyata warna antar perlakuan. Dari hasil penelitian menunjukkan perlakuan konsentrasi enzim dan lama hidrolisis dapat menyebabkan warna HPI lebih gelap walaupun tidak berbeda nyata. Warna yang lebih gelap pada HPI ini terjadi karena pada saat proses hidrolisis terjadi pemutusan ikatan peptida oleh enzim protease menghasilkan gugus amina yang merupakan bahan pereaksi maillard, dimana pada keadaan ini gugus amina protein berikatan dengan gugus aldehyd atau keton dari gula pereduksi sehingga terbentuk polimer nitrogenous berwarna coklat atau yang disebut melanoidin (DeMan, 1999).

Faktor rasio gula terhadap asam amino berpengaruh secara nyata terhadap reaksi pembentukan warna. Makin meningkatnya jumlah asam amino pada produk hidrolisis enzim menyebabkan makin banyak terjadi pembentukan warna. Gugus karbonil dari gula reduksi dan gugus asam amino bebas merupakan komponen penting dalam reaksi maillard. Asam amino lisin adalah jenis asam amino yang paling cepat menghasilkan warna yang disebabkan oleh gugus karbonil pada asam amino ini sangat reaktif. Sebaliknya asam amino sistein adalah yang paling lambat menghasilkan warna. Oleh karena itu bahan pangan yang mengandung asam amino lisin akan lebih mudah menjadi coklat.

Tidak adanya perbedaan warna perlakuan dalam penelitian dapat disebabkan karena ikan tidak mengandung karbohidrat (Ahmed *et al.* 2012) sehingga menurunkan potensi terjadinya reaksi maillard berlebih akibatnya perubahan warna dapat ditekan. Hal ini berbeda dari hasil penelitian Palupi *et al.* (2010) yang menyatakan pada hidrolisis *Volvoriella volva-ceae*, semakin lama waktu hidrolisis, semakin gelap warna hidrolisat.

Tabel 2. Nilai $^{\circ}\text{Hue}$ HPI dari ikan bernilai ekonomi rendah dengan konsentrasi enzim protease biduri dan waktu hidrolisis yang berbeda

Waktu (Jam)	Konsentrasi Enzim (Unit/g)	$^{\circ}\text{Hue}$
0	0	74.5 \pm 0.1
0	0.7	74.4 \pm 0.2
0	1.4	74.4 \pm 0.1
0	2.1	74.7 \pm 0.1
1.5	0	74.3 \pm 0.1
1.5	0.7	74.6 \pm 0.2
1.5	1.4	74.6 \pm 0.4
1.5	2.1	74.4 \pm 0.2
3	0	74.5 \pm 0.2
3	0.7	74.3 \pm 0.2
3	1.4	74.1 \pm 0.4
3	2.1	74.2 \pm 0.2

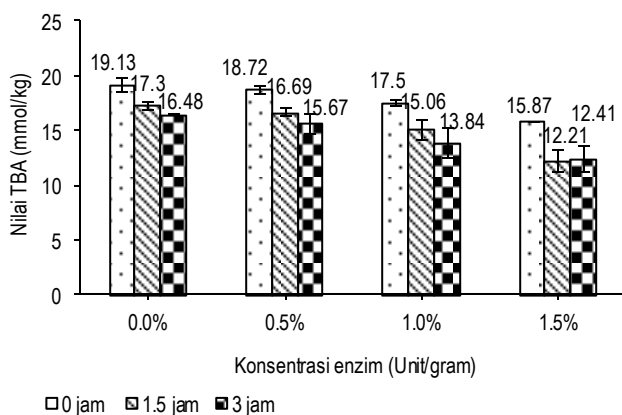
Tingkat ketengikan

Ketengikan disebabkan akibat lepasnya komponen asam lemak bebas yang terdapat pada minyak baik akibat lipolisis maupun reaksi oksidatif. Lipolisis adalah proses hidrolisis ikatan ester pada lemak (triasilgliserol) sehingga menghasilkan asam lemak bebas dan gliserol, sedangkan reaksi oksidatif disebabkan oleh reaksi oksidasi lemak dan minyak. Asam lemak bebas rantai pendek akan menghasilkan bau khas yang tidak sedap yang dikenal dengan istilah tengik. Terbentuknya asam lemak bebas dengan 6-10 rantai hidrokarbon dapat menunjukkan kerusakan pada minyak (Rahman, 2007).

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa aktivitas proteolitik oleh enzim protease pada hidrolisat tempe akan meningkatkan nilai ketengikan produk. Kenaikan ketengikan ini dapat disebabkan karena proses hidrolisis mendorong terbukanya selubung-selubung minyak, yang kemudian terekspos sehingga mudah mengalami oksidasi. Disamping itu, dengan adanya proses hidrolisis oleh enzim protease akan terjadi penguraian protein yang menghasilkan peptida rantai pendek dan asam amino sehingga protein yang dalam bentuk awal dapat berfungsi sebagai antioksidan menjadi rusak dan hilang

sifat fungsionalnya sehingga tidak dapat menghambat proses oksidasi pada hidrolisat tempe (Subagio *et al.* 2002).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi protease biduri dan waktu hidrolisis berpengaruh ($\alpha=0.05$) terhadap tingkat ketengikan HPI dari ikan bernilai ekonomi rendah (Gambar 2). Semakin besar konsentrasi protease biduri, maka tingkat ketengikan (nilai TBA) HPI dari ikan bernilai ekonomi rendah semakin menurun walaupun tidak berbeda nyata, berbeda dengan hasil penelitian pada hidrolisat tempe sebelumnya. Hal ini diduga karena enzim protease biduri yang digunakan dalam bentuk *crude* (kasar). Witono *et al.* (2006) melaporkan bahwa enzim protease yang diekstrak secara langsung dari tumbuhan (batang dan daun) biduri masih mengandung klorofil. Menurut Dalimartha (2003) suatu protease kasar juga dapat mengandung saponin, flavonoid, polifenol, tanin, dan kalsium oksalat. Flavonoid dan polifenol merupakan antioksidan, maka semakin banyak konsentrasi ekstrak kasar enzim yang ditambahkan semakin banyak kandungan antioksidan dalam hidrolisat. Hal ini menyebabkan tingkat ketengikan pada hidrolisat dari ikan bernilai ekonomi rendah semakin kecil dengan adanya peningkatan konsentrasi enzim. Antioksidan dapat menghambat proses ketengikan karena antioksidan lebih reaktif bereaksi dengan oksigen daripada reaksi oksigen dengan lemak. Molekul aktif dari antioksidan menggagalkan terbentuknya peroksida dengan mengikat oksigen yang menyebabkan penghambatan ketengikan pada bahan. Sifat antioksidatif dari *crude protease* biduri ini merupakan fenomena yang menarik untuk ditelaah lebih lanjut.



Gambar 2. Tingkat ketengikan HPI dari ikan bernilai ekonomi rendah pada berbagai konsentrasi protease biduri dan lama hidrolisis. Nilai dinyatakan dalam rata-rata \pm standard deviasi

KESIMPULAN

Perlakuan terbaik proses produksi hidrolisat dari ikan bernilai ekonomi rendah adalah penggunaan enzim dengan konsentrasi protease biduri sebesar 2.1 Unit/g dan waktu hidrolisis 1.5 jam. Hidrolisat terbaik memiliki karakteristik sifat kadar protein terlarut, nilai produk maillard, warna, dan tingkat ketengikan berturut-turut 3.509%; 0.634 (kuning kemerahan), dan 12.210 (mmol/kg).

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terimakasih disampaikan kepada DITLITABMAS Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi atas dana hibah penelitian kompetitif strategis nasional nomor: 112/SP2H/PL/DIT.LITABMAS/V/2013 tanggal 13 Mei 2013 atas nama Dr. Yuli Witono, S.TP.,MP.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmed S, Rahman AFMA, Mustafa MG, Hossain MB, Nahar N. 2012. Nutrient composition of indigenous and exotic fishes of rainfed waterlogged paddy fields in Lakshampur, Bangladesh. *World J Zoo* 7: 135-140. DOI: 10.5829/idosi.wjz.2012.7.2.63162.
- Assoumani MB, Maxime D, Nguyen P. 1994. Evaluation of a lysine-glucose Maillard model system using three rapid analytical methods. *Food Chemistry* 46: 383-387.
- Bhaskar N, Benila T, Radha C, Lalitha RG. 2008. Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of *Calla (Calla calla)* for preparing protein hydrolysate using a commercial protease. *Bioresource Technol* 99: 335-343. DOI: 10.1016/j.biortech.2006.12.015.
- Dalimartha S. 2003. Biduri (*Calotropis gigantea* [Wild.] Dryand. ex W.T.Ait). Pdpersi Jakarta.
- DeMan JM. 1999. Principles of Food Chemistry, 3rd Ed. Aspen Pub. Inc. Gaithersbury, Maryland.
- Dumay J, Donnay-Moreno C, Barnathan G, Jaouen P, Berge. 2006. Improvement of lipid and phospholipid recoveries from sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using industrial proteases. *Process Biochemistry* 41: 2327-2332. DOI: 10.1016/j.procbio.2006.04.005.
- Gbogouri GA, Linder M, Fanni J, Parmentier M. 2004. Influence of hydrolysis degree on the functional properties of salmon byproduct hydrolysates. *Journal of Food Science* 69: C615-C622. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2004.tb09909.x.
- Haslaniza H, Maskat MY, wan Aida WM, Mamot S. 2010. The effects of enzyme concentration, temperature and incubation time on nitrogen content and degree of hydrolysis of protein precipitate from cockle (*Anadara granosa*) meat wash water. *Int Food Res J* 17: 147152.
- Hofmann T, Bors W, Stettmajer K. 1999. Studies on radical intermediates in the early stage of the nonenzymatic browning reaction of carbohydrates and amino acids. *J Agr Food Chem* 47: 379 -390.
- Hurrell RF, Lerman P, Carpenter KKJ. 1979. Reactive lysine in foodstuffs as measured by dye-binding procedure. *J Food Sci* 44: 1221-1227. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1979.tb03485.x.
- Hutching JB. 1994. Food Colour and Appearance. Glasgow: Blackie Academic and Professional.
- Je JY, Qian ZJ, Lee SH, Byun HG, Kim SK. 2008. Purification and antioxidant properties of bigeye tuna (*Thunnus obesus*) dark muscle peptide on free radical-mediated oxidative systems. *J Med Food* 11: 629-637.

- Koesoemawardani D, Nurainy F, Hidayati S. 2011. Proses pembuatan hidrolisat protein ikan rucah. *Jurnal Natur Indonesia* 13: 256 -261.
- Kunst A. 2000. Enzymatic modification of soy proteins to improve their functional properties. *Magazine Industrial Protein* 8: 9-11.
- Marchbank T, Elia G, Playford RJ. 2009. Intestinal protective effect of a commercial fish protein hydrolysate preparation. *Regul Peptides* 155: 105-109. DOI: 10.1016/j.regpep.2009.02.003.
- Miao S, Roos YH. 2004. Comparison of nonenzymatic browning kinetics in spray-dried and freeze-dried carbohydrate-based food model systems. *J Food Sci* 69: 322–331. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2004.tb13637.x.
- Mottram DS. 1998. Umami Flavor of Meat, In *Flavor of Meat, Meat Products and Seafoods*, Shahidi F. (Ed.). Blackie Academic and Professional, London.
- Mubarik NR, Suwanto A dan Suhartono MT, 2000. Isolasi dan Karakterisasi Protease Ekstraseluler dari isolat Bakteri Termofilik Ekstrim. [Prosiding]. Seminar Nasional Industri Enzim dan Bioteknologi II. Mikrobiologi, Enzim dan Bioteknologi Dalam Perspektif Ekonomi dan Industri. Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi, Jakarta, 15-16 Februari 2000. 151–158.
- Nolsoe H, Undeland I. 2009. The acid and alkaline solubilisation process for the isolation of muscle proteins: State of the art. *Food Bioprocess Technol* 2: 1-27. DOI: 10.1007/s11947-008-0088-4.
- Palupi NW, Windrati SW, Tamarini. 2010. The effect of enzymatic hydrolysis on the properties of protein hydrolysate from paddy mushroom. *Makara Teknologi* 14: 73-76.
- Radha C, Kumar PR, Prakash V. 2008. Preparation and characterization of a protein hydrolysate from an oilseed flour mixture. *Food Chem* 106: 1166-1174. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.07.063.
- Rahman MS. 2007. *Handbook of Food Preservation*, 2nd Ed. CRC Press. Boca Raton.
- Standar Nasional Indonesia [SNI]. 2006. SNI 01-2729.3 -2006. Ikan segar – Bagian 3: Penanganan dan pengolahan. Badan Standardisasi Nasional, Jakarta
- Subagio A, Hartanti S, Windrati WS, Unus, Fauzi M, Herry B. 2002. Kajian sifat fisikokimia dan organoleptik hidrolisat tempe hasil hidrolisis protease. *J Teknol Industri Pangan* 8: 204–210.
- Wang JS, Zhao MM, Zhao QZ, Bao Y, Jiang YM. 2007. Characterization of hydrolysates derived from enzymatic hydrolysis of wheat gluten. *J Food Sci* 72: C103–C107. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2006.00247.x.
- Walker JM. 2002. *The Protein Protocols Handbook*. 2nd Ed. 3–10. Humana Press, New Jersey.
- Wergedahl H, Liaset B, Gudbrandsen OA, Lied E, Espe M, Muna Z, Mork S, Berge RK. 2004. Fish protein hydrolysate reduces plasma total cholesterol, increases the proportion of HDL cholesterol, and lowers acyl-CoA: Cholesterol acyltransferase activity in liver of Zucker rats. *J Nutr* 134: 1320-1327.
- Wijayanti AT. 2009. Kajian Penyaringan dan Lama Penyimpanan dalam Pembuatan Fish Peptone dari Ikan Selar Kuning (*Caranx leptolepis*). [Skripsi]. Bogor: Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor
- Witono Y, Subagio A, Susanto T, Widjanarko SB. 2006. Membandingkan Kinerja Protease Biduri dengan Protease Komersial. [Prosiding]. Seminar Nasional - Perhimpunan Ahli Teknologi Pangan Indonesia (PATPI), Yogyakarta 2-3 Agustus 2006.
- Witono Y, Aulanni'am, Subagio A, Widjanarko SB. 2007. Purifikasi dan karakterisasi parsial enzim protease dari tanaman biduri (*Calotropis gigantea*). *J Teknol Industri Pangan* 18: 1-9.
- Witono Y, Woo Won Kang. 2010. Specific Characteristic of Novel Cysteine Protease From Indonesian 'Biduri' Plant (*Calotropis gigantea*). [Proceeding] The Korea Food Conference and Symposium, Incheon Korea 17-18 June 2010.