



Pengaruh Variasi Konsentrasi Sodium Klorida terhadap Hidrolisis Protein Ikan Lemuru (*Sardinella lemuru* Bleeker, 1853) oleh Protease Ekstrak Nanas (*Ananas comosus* [L.] Merr. var. *Dulcis*)

Wuryanti Handayani, Anak Agung Istri Ratnadewi, dan Agung Budi Santoso
*Departemen Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Jember*

Abstract

*The research about the effects of variation of sodium chloride (NaCl) concentration on the hydrolysis product of lemuru fish protein (*Sardinella lemuru* Bleeker, 1853) by use pineapple (*Ananas comosus* [L.] Merr. variety of *Dulcis*) extract protease has been carried out. The aims of this research were to evaluate the effects of variation of NaCl concentration on the soluble protein contents, protein cleavage characteristics, and the degree of hydrolysis (DH) on protein hydrolysate of lemuru fish. Fish protein hydrolysate obtained by hydrolysis reaction of lemuru fish slurry protein by pineapple extract protease at incubation temperature of 37°C for five days. Soluble protein contents determined based on Formol Titration method, while cleavage characteristics evaluate based on application of SDS-PAGE electrophoresis. Degree of hydrolysis of fish protein hydrolysate estimated by TNBS method. The variation of NaCl concentration were 0.0%, 5.0%, 10.0%, 15.0%, and 20.0% w/w resulted in soluble protein content were 2.98%, 3.23%, 3.39%, 4.23%, and 3.40%, respectively; whereas the value of degree of hydrolysis (DH) reach for 4.13%, 5.37%, 6.52%, 33.48%, and 24.09%, respectively. Pineapple extract protease causes hydrolysis of slurry protein of lemuru fish at all variation of NaCl concentration. It is supported by electrophoretogram which not provide of protein bands at molecular weight over 14.2×10^3 Da. Maximum hydrolysis process occurred on NaCl concentration of 15.0% w/w with soluble protein content and degree of hydrolysis (DH) optimum. This phenomena indicating the same trend between soluble protein content and degree of hydrolysis.*

Keywords: *pineapple extracts protease, fish slurry protein, soluble protein, degree of hydrolysis (DH).*

Pendahuluan

Salah satu produk buah-buahan di Indonesia adalah nanas (*Ananas* sp.). Ditinjau dari komposisi kimiawinya, buah nanas mengandung enzim protease yang memiliki kemampuan untuk menghidrolisis molekul protein besar menjadi molekul yang lebih kecil dan sederhana. Keberadaan enzim ini pun hampir merata pada seluruh bagiannya, yang meliputi buah, tangkai, kulit, daun, hati atau empulur, hingga batangnya

(Cooreman *et al.* 1976; Winarno 1993). Salah satu pemanfaatan enzim ini adalah pada proses pengolahan kecap ikan enzimatis (Handayani dan Ratnadewi 2005).

Penggunaan enzim pada proses pengolahan ikan nantinya akan lebih menguntungkan bila dibandingkan dengan penggunaan metode hidrolisis asam. Di samping itu, keberadaan garam dalam pengolahan pangan terutama pada pengolahan ikan adalah salah satu komponen

yang tidak dapat diabaikan. Penggunaan salah satu garam seperti NaCl telah sering dilakukan berkenaan dengan prasyarat organoleptik sebuah produk pangan. Pengaruh lebih lanjut terhadap nilai gizi makanan belumlah mendapatkan perhatian yang begitu besar. Menurut Hudaya dan Daradjat (1981), konsentrasi NaCl yang tinggi mampu mengubah banyak faktor dalam komposisi nilai gizi berbagai pangan. Pada aplikasinya, NaCl ternyata mampu mempengaruhi kelarutan protein.

Mengacu pada berbagai uraian tersebut maka diperlukan adanya suatu kajian mengenai pengaruh variasi konsentrasi NaCl terhadap hasil hidrolisis protein daging ikan segar oleh protease dari ekstrak nanas (*Ananas sp.*). Kajian dilakukan terhadap beberapa parameter penelitian yang meliputi kadar protein terlarut hidrolisat, karakter pemotongan protein hidrolisat yang dihasilkan, serta derajat hidrolisisnya.

Metode Penelitian

Penanganan Bahan

Buah nanas dan ikan lemuru yang diperoleh dibersihkan untuk mendapatkan daging buah nanas dan daging ikan segar tanpa kepala. Setelah biomaterial tersebut diketahui massanya, selanjutnya dikelompokkan sesuai dengan variasi perlakuan penelitian.

Ekstraksi Protease Ekstrak Nanas

Tahap ekstraksi dilakukan menurut metode Praptiningsih (1989) yang dimodifikasi pada temperatur ruang ($\pm 24^{\circ}\text{C}$). Sebanyak 100 gram daging buah nanas dihaluskan menggunakan blender. Setelah halus, larutan kemudian dihomogenisasi dalam 100 ml buffer fosfat 0,2 M (pH 7,0).

Homogenat yang dihasilkan disentrifugasi pada 7500 rpm selama 15 menit. Supernatan yang dihasilkan merupakan ekstrak kasar enzim protease yang selanjutnya disebut sebagai protease ekstrak nanas.

Preparasi Slurry Daging Ikan Lemuru

Sebanyak 200 gram daging ikan lemuru dihaluskan dengan blender. *Slurry* yang dihasilkan kemudian ditimbang sebanyak 10 gram yang selanjutnya digunakan pada tahap inkubasi.

Inkubasi Enzimatis Slurry Daging Ikan

Slurry daging ikan dicampurkan dengan ekstrak bromelin pada rasio 2 : 1. Demikian pula dengan BSA, sedangkan blanko merupakan *slurry* ikan tanpa penambahan ekstrak bromelin. Campuran *slurry* daging ikan dengan ekstrak bromelin kemudian dibagi menjadi lima bagian, di mana masing-masing dilakukan penambahan NaCl sebesar 0,0; 5,0; 10,0; 15,0; dan 20,0% b/b.

Proses inkubasi kemudian dilakukan pada temperatur 37°C yang dimulai dengan hari ke-0 hingga hari ke-5. Pada hari kelima, reaksi hidrolisis diterminasi melalui penambahan 2 ml TCA. Produk kemudian dilakukan sentrifugasi selama 20 menit pada 3000 rpm. Filtrat yang dihasilkan selanjutnya disebut sebagai hidrolisat protein ikan.

Penentuan Kadar Protein Terlarut

Kadar protein terlarut ditentukan berdasarkan metode titrasi formol (Sudarmadji dkk. 1997).

Elektroforesis Pemotongan Protein Ikan

Pemotongan protein ikan diketahui berdasarkan munculnya pita-pita dalam elektroforegram. Elektroforesis dilakukan menurut metode Bollag *et al.* (1996) menggunakan elektroforesis gel poliakrilamida-sodium dodesil sulfat (SDS-PAGE).

Penentuan Derajat Hidrolisis (DH)

Derajat hidrolisis ditentukan menurut metode TNBS (Adler-Nissen 1979). Sebanyak 30,0 μl sampel dalam buffer fosfat 4,0% b/v (pH 8,2) dan 100,0 μl larutan TNBS diinkubasi selama 120 menit pada temperatur 40°C . Campuran selanjutnya dihidrolisis dan reaksinya diterminasi dengan penambahan 378,0 μl HCl 1,0 N.

Pembacaan absorbansi dilakukan pada λ 340 nm. Persentase derajat hidrolisis ditentukan berdasarkan persamaan berikut.

$$DH \text{ (\%)} = \frac{h}{h_{tot}} \times 100 \text{ \%} \quad \dots (1)$$

Di mana:

- H : jumlah ikatan peptida yang dihidrolisis ($\text{mek.g}_{\text{protein}}^{-1}$)
 $m_{\text{glisin sampel}}$: massa glisin yang terkandung dalam sampel (mg)
 V_{sampel} : volume sampel yang digunakan (ml)
 BE_{glisin} : berat ekuivalen glisin = 75,07 mg.mek^{-1}
 $C_{\text{protein sampel}}$: kadar protein yang terkandung dalam sampel (g.ml^{-1})
 $\alpha; \beta$: konstanta ($\alpha = 1,00; \beta = 0,40$) (Adler-Nissen, 1979)
 h_{tot} : konstanta jumlah total ikatan peptida dalam substrat untuk tiap massa (gram) protein (ikan = 8,60 [Adler-Nissen 1979])

Kadar protein ditentukan berdasarkan metode Lowry (Lowry *et al.* 1951). Standar yang digunakan adalah *bovine serum albumin* (BSA).

Penyajian dan Analisis Data

Analisis terhadap data yang dihasilkan dilakukan menggunakan metode kuadrat terkecil (*least square method*) regresi Galton yang dikerjakan secara komputerisasi program *Microsoft Excel Worksheet*.

Hasil dan Pembahasan

Protease ekstrak nanas merupakan sekelompok enzim dengan aktivitas proteolitik yang terkandung pada berbagai spesies nanas (*Ananas sp.*). Keberadaan protease ekstrak nanas di dalam sel bersifat intraseluler atau endoenzim. Sebagai suatu endoenzim, protease ekstrak nanas dapat diproduksi melalui isolasi kontinu berupa penghancuran jaringan sampel (daging buah) dan homogenisasi, serta teknik pemisahan melalui sentrifugasi. Pada penelitian ini, penghancuran jaringan sampel dilakukan

menggunakan blender sekaligus agar diperoleh luas permukaan sel yang lebih optimal. Pada tahap pertama penelitian ini, protease berhasil diisolasi dari daging buah nanas beku pada kondisi temperatur ruang. Protease ini kemudian disebut sebagai protease ekstrak nanas. Selanjutnya protease ini digunakan untuk menghidrolisis protein daging ikan lemuru dalam *slurry*. Langkah awal terpenting dalam upaya memperoleh hidrolisat protein ikan lemuru adalah ekstraksi protein kasar ikan lemuru dengan menghancurkan jaringan dagingnya. Pada penelitian ini *slurry* ikan dihasilkan dari ± 200 gram daging ikan. Proses hidrolisis oleh protease ekstrak nanas terhadap *slurry* daging ikan lemuru yang ditambah NaCl dengan konsentrasi bervariasi menghasilkan hidrolisat protein ikan lemuru. Hidrolisis tersebut dilakukan dalam kondisi inkubasi bertemperatur konstan 37°C selama lima hari tanpa adanya pengaruh tingkat keasaman eksternal. Adisi NaCl pada proses hidrolisis akan mempengaruhi proses hidrolisis. Hidrolisis yang terjadi diamati berdasarkan tiga parameter yang kemudian diperoleh hasil sebagai berikut.

Kadar Protein Terlarut pada Berbagai Konsentrasi NaCl

Protease ekstrak nanas yang diberikan pada *slurry* daging ikan lemuru akan mengkatalisis hidrolisis amida dan esternya, ikatan peptida secara spesifik pada protein dengan ikatan yang melibatkan asam amino dasar dengan gugus R yaitu ala, asn, gly, ile, leu, lys, tyr, try, dan val (FAO-WHO/UN 1972; Silverstein dan Kezdy 1975; Mathews dan van Holde 1990). Dengan kata lain protease ini akan mengkatalisis penguraian ikatan peptida internal pada rantai protein untuk menghasilkan polipeptida atau peptida dengan berat molekul rendah dan pembentukan gugus amino bebas. Berdasarkan hal tersebut maka reaksinya dapat diikuti melalui estimasi peningkatan jumlah gugus amino bebas menggunakan sistem titrasi formol. Profil jumlah protein terlarut atau gugus amino bebas yang dihasilkan diberikan dalam format histogram pada Gambar 1.

Berdasarkan histogram tersebut tampak bahwa secara kinetika, protease ekstrak nanas dapat menghidrolisis protein-protein ikan lemuru

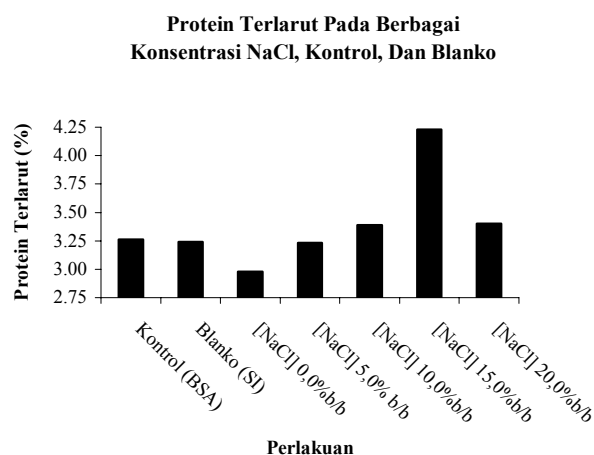
yang ditandai dengan masih terbentuknya produk protein terlarut. Protein terlarut atau gugus amino bebas yang dihasilkan memiliki kuantitas yang rendah, padahal daging ikan sebagai bahan baku pembuatan hidrolisat protein memiliki kelebihan berupa dagingnya yang berserat seperti hewan mamalia darat namun dengan serat yang lebih halus dan lebih pendek ukurannya, memiliki lebih sedikit jaringan ikat dan tidak mengandung elastin sehingga protein ikan lebih mudah dihidrolisis (Gaman dan Sherrington 1981; Hadiwiyoto 1993).

Rendahnya kuantitas tersebut disebabkan protease ekstrak nanas bersifat endoprotease yang hanya menghidrolisis ikatan peptida internal dari rantai protein *slurry* daging ikan. Menurut Hanford (1967), eksoprotease yang menghidrolisis ikatan peptida terminal pada suatu rantai protein akan menghasilkan dipeptida dan asam amino terlarut yang lebih besar daripada sistem endoprotease.

Selain itu tampak pula pada histogram bahwa kadar protein terlarut atau jumlah gugus amino bebas meningkat seiring dengan bertambahnya konsentrasi NaCl hingga 15% b/b. Fenomena ini mengindikasikan bahwa NaCl sebagai suatu garam dapat menyebabkan atau merupakan inducer protein-protein substrat maupun protein terlarut atau gugus amino bebas hasil proses hidrolisis untuk mengalami *salting-in* atau peningkatan kelarutan dalam suatu larutan garam. Protein substrat dan protein enzim akan

mengalami reaksi enzimatik dengan kelarutan normal pada konsentrasi NaCl 0% b/b. Halangan sterik (*steric hindrance*) tidak akan menghambat reaksi akibat semakin banyaknya produk yang dihasilkan, namun reaksi enzimatik ini berlangsung dalam kondisi spesifitas yang tinggi. Reaksi enzimatik yang melibatkan protein substrat dan protein enzim dengan konsentrasi NaCl 5 hingga 15% b/b berlangsung lebih intens seiring dengan meningkatnya kondisi kelarutan reaksi, sehingga dihasilkan produk protein terlarut lebih banyak. Peningkatan kelarutan awal ini berkaitan dengan adanya stabilisasi protein. Walaupun demikian, terjadinya *salting-in* hanya berlangsung hingga peningkatan konsentrasi 15% b/b NaCl, atau dengan kata lain kadar garam optimum untuk kadar protein terlarut adalah sebesar 15,0%. Hadiwiyoto (2000) memperoleh kadar garam optimum pada proses hidrolisis ikan kembung dan ikan merah sebesar 10% b/b.

Proses *salting-in* ditandai dengan terjadinya peningkatan kelarutan suatu protein dalam suatu larutan garam. Proses ini akan meningkatkan kekuatan ionik (*ionic strength, I*) pada larutan hingga tercapai suatu kondisi optimum dan dilanjutkan dengan terjadinya penurunan kelarutan protein atau yang disebut *salting-out*. Selama *salting-out* ini terjadi kompetisi antara protein dan garam untuk mendapatkan ketersediaan molekul air yang akan digunakan dalam proses solvasi, sehingga interaksi protein-protein akan meningkat (Plummer 1971).



GAMBAR 1: Histogram protein terlarut pada berbagai perlakuan hidrolisis

Pada penelitian ini atau berdasarkan Gambar 1, tampak bahwa proses *salting-out* telah terjadi pada pemberian NaCl dengan konsentrasi 20,0% b/b, yang ditandai dengan penurunan kadar protein terlarut atau gugus amino bebas. Reaksi enzimatis yang melibatkan protein substrat dan protein enzim dengan konsentrasi NaCl 20,0% b/b ini berlangsung lebih lambat seiring dengan berkurangnya kondisi kelarutan reaksi, sehingga dihasilkan produk protein terlarut yang lebih sedikit. Hal ini terjadi akibat semakin kecilnya kesempatan reaksi karena terjadinya interaksi yang lebih besar antara protein-protein substrat, protein-protein enzim, maupun protein-protein terlarut daripada interaksi protein untuk reaksi sebagaimana mestinya atau protein dengan pelarutnya, yang pada akhirnya menimbulkan deakselerasi kecepatan hidrolisis. Interaksi protein-protein terlarut yang lebih besar, menurut Mathews dan van Holde (1990) menyebabkan penurunan aktivitas pelarut sehingga kelarutan protein dalam pelarut akan berkurang yang pada akhirnya protein akan mengendap secara langsung.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan blanko (*slurry* ikan) yang merupakan representasi dari seluruh protein yang terkandung dalam ikan baik sebagai enzim maupun senyawaan protein memiliki kadar protein terlarut yang identik dengan kontrol (BSA). Hal tersebut dapat terjadi karena adanya enzim pengurai protein yang mampu menyebabkan autodegradasi protein *slurry* ikan yang sebelumnya tidak terhidrolisis oleh keberadaan protease ekstrak nanas. Selain itu kerja protease ekstrak nanas terbatas hanya memotong protein pada ikatan asam amino *ala*, *asn*, *gly*, *ile*, *leu*, *lys*, *tyr*, *try*, dan *val*, sedangkan enzim-enzim pengurai protein akan mampu memotong rangkaian asam amino suatu protein secara lebih bebas.

Protein daging atau otot ikan terdiri dari tiga kelompok utama yaitu sarkoplasma, miofibril, dan stroma. Protein miofibril merupakan bagian terbesar dan merupakan jenis protein yang larut dalam garam. Protein ini terdiri dari miosin, aktin, tropomiosin, dan aktomiosin yang merupakan gabungan aktin dan miosin (Subagio dkk. 2005). Bila ditinjau berdasarkan kelarutan protein secara umum, Mathews dan van Holde (1990) serta Whitaker (1994) mengemukakan bahwa kelarutan suatu protein sangat dipengaruhi

oleh keberadaan garam berkonsentrasi tertentu dalam larutannya atau adanya peningkatan hidrasi molekul. Penurunan derajat hidrasi akan terjadi apabila terdapat induksi garam-garam seperti NaCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Na_2SO_4 , maupun MgCl_2 . Pengaruh garam-garam tersebut pada kelarutan suatu protein sangat bervariasi. Hal ini didukung pula oleh beberapa faktor yang mempengaruhi kelarutan protein tersebut misalnya temperatur, pH, karakteristik protein, karakteristik garam yang digunakan, dan konsentrasi protein. Berdasarkan hubungan antara kelarutan protein dan konsentrasi garam sebagaimana yang dinyatakan pada persamaan $\log S = \beta - K_s \mu$ akan tampak sejauh mana pengaruh faktor tersebut pada kelarutan protein.

Temperatur dan pH kondisi reaksi hanya mempengaruhi besaran kelarutan protein tanpa adanya garam apapun (β). Pada umumnya akibat peningkatan temperatur atau perubahan pH hingga jauh dari pH minimum kelarutannya, maka nilai β akan bertambah. Karakteristik dan konsentrasi protein akan mempengaruhi nilai β dan K'_s (konstanta *salting-out*), sedangkan karakteristik garam yang terlibat dalam reaksi sebatas hanya mempengaruhi K'_s karena β hanya merupakan besaran kelarutan protein dalam larutan tanpa eksistensi garam. Karakteristik polaritas protein juga mempengaruhi kemampuan pengendapannya. Kusumaningsih (2003) menyebutkan bahwa konsentrasi garam yang lebih rendah diperlukan untuk mengendapkan protein dengan asam amino yang bersifat sangat hidrofobik (*phe*, *ile*, *leu*, *met*, *try*, dan *val*) pada bagian dalam protein globular daripada protein dengan asam amino yang sangat hidrofilik (*arg*, *asp*, *glu*, *asn*, *gln*, *lys*, dan *his*) pada permukaan luar protein globular (Lehninger 1997).

Pada prosesnya, osmosis dapat terjadi pada daging ikan yang dicampurkan dengan larutan garam. Membran sel kulit dan daging ikan yang bersifat selektif permeabel berperan meloloskan garam yang lebih pekat di luar membran sehingga garam berpenetrasi menembus membran sel. Air yang terkandung dalam sel ikan secara otomatis akan terdesak keluar dan hampir semua zat-zat terlarut penting tetap berada di dalam sel hingga tercapai suatu ekuilibriasi tekanan osmosis di dalam dan luar sel (Moeljanto 1982).

Prinsip dasar dari sistem titrasi formol yang digunakan adalah terjadinya suatu kesetimbangan antara asam dan basa. Sistem titrasi ini melibatkan reaksi formaldehid dengan gugus amino ($-\text{NH}_2$) melalui pembentukan senyawa monometilol dan dimetilol. Formaldehid tidak akan bereaksi dengan gugus amino yang bermuatan ($-\text{NH}_3^+$) sehingga pengaruh penambahannya akan tampak pada pergeseran pH gugus amino yang menjadi lebih rendah. Oleh sebab itu jumlah alkali yang dibutuhkan untuk menetralkan peningkatan keasaman ini akan berbanding lurus dengan jumlah terukur gugus amino bebas yang terbentuk. Walaupun demikian tiap molekul peptida maupun asam amino memiliki daya reaksi baik dengan asam maupun basa yang bervariasi tergantung pada letak dan jumlah gugus amino serta karboksilnya (Winarno 1980).

Berdasarkan hasil penelitian ini berhasil diungkap bahwa hingga konsentrasi NaCl 15,0% b/b sebagai komponen hidrolisis akan dihasilkan jumlah gugus amino bebas atau protein terlarut hasil hidrolisis yang maksimum.

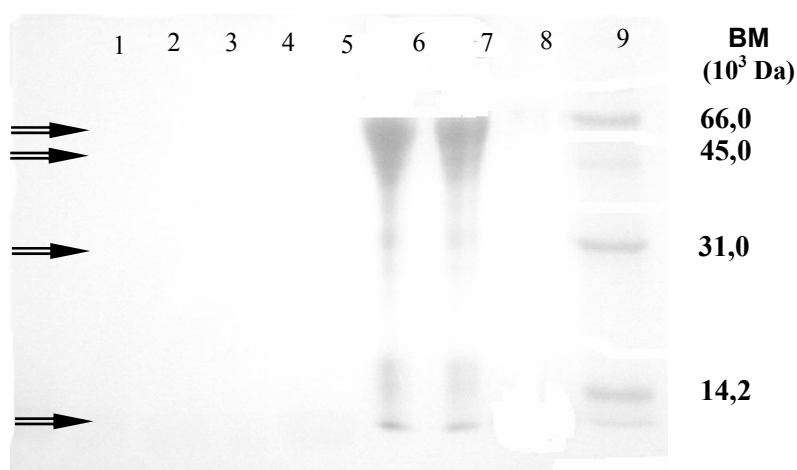
Elektroforetogram Karakteristik Hidrolisis Protein Ikan Lemuru

Karakteristik hidrolisis secara enzimatik pada protein ikan lemuru diketahui berdasarkan

elektroforetogram yang dihasilkan dari elektroforesis. Pada penelitian ini digunakan SDS-PAGE diskontinyu dengan *resolving gel* 12,0% dan *stacking gel* 8,0%. Elektroforetogram hidrolisat protein ikan lemuru dan perbandingannya dengan BSA yang dihidrolisis tertera pada Gambar 2.

Bila ditinjau berdasarkan berat molekulnya, tampak bahwa protein ikan dengan konsentrasi NaCl antara 0,0 hingga 20,0% tidak menunjukkan pita-pita hidrolisat protein yang berarti pada berat molekul lebih dari $14,2 \times 10^3$ Dalton. Hal ini mengindikasikan bahwa hidrolisat protein ikan lemuru yang terbentuk memiliki berat molekul lebih kecil dari $14,2 \times 10^3$ Dalton. Lain halnya dengan BSA (kontrol) yang masih menunjukkan empat pita hidrolisat dengan fraksi pada *Rf* yaitu 0,316, 0,404, 0,596, dan 1,000.

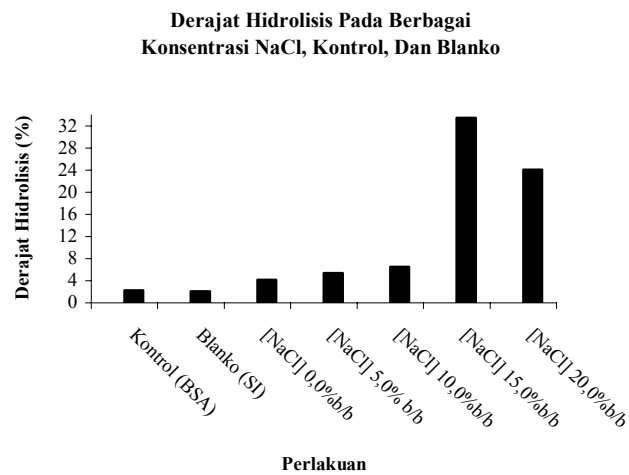
Estimasi berat molekul tiap protein diketahui berdasarkan perbandingan jarak mobilitas yang dinyatakan sebagai *Rf* (retention factor) dengan marker (kit pencari protein standar). Berat molekul (BM) relatif hidrolisat protein ikan dan BSA dapat ditentukan melalui data *Rf* dan persamaan $\log \text{berat molekul} = -0,9951 \text{ migrasi relatif } Rf + 5,0875$, diperoleh informasi berat molekul relatif hidrolisat protein ikan dan BSA seperti yang diberikan pada Tabel 1.



GAMBAR 2: Elektroforetogram hidrolisat protein. Lajur 1: [NaCl] 20,0% b/b; lajur 2: [NaCl] 0,0% b/b; lajur 3: [NaCl] 5,0% b/b; lajur 4: [NaCl] 10,0% b/b; lajur 5: [NaCl] 15,0% b/b; lajur 6 dan 7: BSA; lajur 9: *marker*

TABEL 1: BM Relatif Protein Sampel Berdasarkan Nilai R_f yang Berbeda

No.	Perlakuan	Migrasi (cm)	R_f	BM Relatif (x 10 ³ Dalton)	Log BM
1.	<i>Bovine serum albumin</i> (marker)	1,7	0,298	61,796/66,0	4,791
2.	<i>Bovine serum albumin</i> (sampel)	1,8	0,316	59,299/66,0	4,773
		2,3	0,404	48,471/45,0	4,685
		3,4	0,596	31,219/31,0	4,494
		5,7	1,000	12,371	4,092
3.	<i>Chicken egg albumin</i> (marker)	2,3	0,404	48,471/45,0	4,685
4.	<i>Bovine carbonic anhydrase</i> (marker)	3,4	0,596	31,219/31,0	4,494
5.	<i>Bovine milk α-lactalbumin</i> (marker)	5,4	0,947	13,968/14,2	4,145
6.	<i>Tracking dye</i>	5,7	1,000	12,371	4,092
7.	Hidrolisat protein ikan				
	a. [NaCl] 0,0 % b/b	5,7	1,000	12,371	4,092
	b. [NaCl] 5,0% b/b	5,7	1,000	12,371	4,092
	c. [NaCl] 10,0% b/b	5,7	1,000	12,371	4,092
	d. [NaCl] 15,0% b/b	5,7	1,000	12,371	4,092
	e. [NaCl] 20,0% b/b	5,7	1,000	12,371	4,092



GAMBAR 3: Histogram derajat hidrolisis pada berbagai perlakuan hidrolisis

Karakteristik pemotongan protein pada hidrolisis telah sering divisualisasi menggunakan elektroforesis baik melalui PAGE (Keenan dan Shaklee 1985) maupun SDS-PAGE (Lin *et al.* 1997; Kristinsson dan Rasco 2000b). Selain itu estimasi berat molekul hidrolisatnya juga telah dilakukan menggunakan kromatografi filtrasi gel (Hoyle dan Merrit 1994), *high performance size-exclusion chromatography* HPSEC (Lin *et al.*, 1997), dan *electrospray mass spectroscopy* ESMS (Harrach *et al.* 1998).

Secara keseluruhan, pita-pita protein hidrolisat baik pada perlakuan hidrolisis dengan

penambahan NaCl maupun kontrol (BSA) mengindikasikan suatu pita protein terlarut. Walaupun demikian, kadar protein terlarut tersebut tidak dapat merepresentasikan jumlah maupun berat molekul pita-pita protein hidrolisat.

Derajat Hidrolisis pada Berbagai Konsentrasi NaCl

Derajat hidrolisis adalah parameter umum yang digunakan untuk menggambarkan hasil proses dan indikator terjadinya proses hidrolisis. Pada penelitian ini derajat hidrolisis digunakan

sebagai parameter keberhasilan *monitoring* proteolisis pada kondisi pH konstan dan kadar garam yang bervariasi.

Derajat hidrolisis merupakan salah satu parameter dasar yang perlu dikendalikan karena sifat dari hidrolisat protein berhubungan erat dengan parameter tersebut (Nielsen 2001). Pengendalian ini diperlukan karena daya hidrolitik suatu enzim dapat bervariasi berdasarkan sumber dan substrat yang digunakan. Mengacu pada metode TNBS (Adler-Nissen 1979) yang diadopsi pada penelitian ini, derajat hidrolisis didefinisikan sebagai prosentase rasio antara jumlah ikatan peptida yang dihidrolisis (h) dan jumlah total ikatan peptida dalam substrat yang digunakan (h_{tot}). Profil derajat hidrolisis yang dihasilkan diberikan dalam format histogram pada Gambar 3. Berdasarkan histogram tersebut tampak bahwa besarnya derajat hidrolisis ini terkait erat dengan jumlah produk hidrolisat yang dihasilkan, atau dengan kata lain besarnya derajat hidrolisis memiliki kecenderungan yang sama dengan jumlah protein terlarut atau gugus amino bebas.

Pada penelitian ini derajat hidrolisis meningkat seiring dengan bertambahnya konsentrasi NaCl. Hal ini mengindikasikan bahwa proses hidrolisis sebaiknya dilakukan pada temperatur reaksi yang digunakan yaitu 37°C dengan adisi NaCl hingga konsentrasi 15,0% b/b. Kondisi optimum proses hidrolisis yang tercapai pada konsentrasi NaCl 15,0% b/b merupakan tolok ukur maksimum hidrolisis protein-protein *slurry* daging ikan lemuru oleh protease ekstrak nanas. Lebih lanjut lagi peningkatan konsentrasi NaCl ternyata akan menurunkan derajat hidrolisis seperti yang tampak pada konsentrasi 20,0% b/b. Sedangkan derajat hidrolisis pada kontrol dan blanko relatif memiliki nilai yang sama. Hal tersebut mengindikasikan bahwa ikatan-ikatan peptida yang terdapat pada kedua perlakuan tersebut juga terhidrolisis. Kondisi tersebut ditunjukkan oleh terbentuknya glisin akibat dari proses pemotongan rantai peptida oleh enzim.

Menurut Kristinsson dan Rasco (2000a), derajat hidrolisis, substrat, dan protease yang digunakan akan dapat mempengaruhi karakteristik fisikokimia hidrolisat yang dihasilkan. Secara langsung, derajat hidrolisis ini berkorelasi

dengan kadar protein terlarut. Kedua parameter tersebut berhubungan erat dengan karakter pemotongan yang ditunjukkan pada elektroforesis. Kedua parameter tersebut menunjukkan terjadinya hidrolisis melalui visualisasi pita-pita protein dengan berat molekul rendah. Berdasarkan derajat hidrolisisnya, elektroforetogram seperti yang tampak pada Gambar 2 tidak dapat dijadikan tolok ukur besarnya derajat hidrolisis. Hal ini disebabkan parameter yang digunakan pada penentuan derajat hidrolisis hanya didasarkan pada pemotongan ikatan yang melibatkan glisin. Sedangkan proses hidrolisis *slurry* daging ikan oleh protease ekstrak nanas terjadi dengan melibatkan beberapa ikatan yang dihubungkan oleh rantai *ala*, *asn*, *gly*, *ile*, *leu*, *lys*, *tyr*, *try*, dan *val*.

Kesimpulan

Analisis mengenai pengaruh variasi konsentrasi NaCl (0,0%, 5,0%, 10,0%, 15,0% dan 20,0% b/b) terhadap hidrolisis protein ikan lemuru menunjukkan bahwa kondisi optimum hidrolisat tercapai pada konsentrasi NaCl 15,0% b/b. Hidrolisat protein ikan tersebut mengandung protein terlarut sebesar 4,23% dengan berat molekul kurang dari $14,2 \times 10^3$ Da, dan derajat hidrolisis yang dimiliki sebesar 33,48%.

Ucapan Terimakasih

Terimakasih kepada Ir. Ahmad Subagio, M. Agr.Sc., Ph. D. selaku Kepala Laboratorium Pusat Pengendalian Mutu Bogasari Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember, para teknisi/laboran, konsultan, dan editor yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Daftar Pustaka

- Adler-Nissen, J. 1979. Determination of the Degree of Hydrolysis of Food Protein Hydrolysates by Trinitrobenzenesulfonic Acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **27**: 1256-1262.
- Andrian. 1957. Composition and Nutritive Value of Fish Preserved under Different Condition: Salted and Dried African Sample Commercial Fish Meal and *Naoe-Mam*. *Annales de la Nutrition et de l'Alimentation*. **11**: 27.

- Cooreman, W. M., Scharpe, S., Demeester, J., and Leuwers, A. 1976. Bromelain. Biochemical and Pharmacological Properties. *Pharmaceutica Acta Helveticae*. **51**: 73-81.
- FAO-WHO/UN. 1972. Specifications for the Identity and Purity of Some Enzymes and Certain Other Substances. *Fifteenth Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. FAO Nutrition Meetings Report Series No. 50B*. Food and Agriculture Organization of the United Nations World Health Organization. Rome.
- Gaman, P. M. and Sherrington, K. B. 1981. *The Science of Food. An Introduction to Food Science, Nutrition and Microbiology*. Ed.2. Oxford: Pergamon Press Plc.
- Giyatmi. 2000. Prospek Hidrolisat Protein Ikan Sebagai Pemerkaya Nutrisi Makanan. *Makalah Pribadi Pengantar ke Falsafah Sains (PPS702) Program Pasca Sarjana/S3 Institut Pertanian Bogor*. Program Pasca Sarjana/S3 Institut Pertanian Bogor. Bogor. 10 hal.
- Hadiwiyoto, S. 1993. *Teknologi Pengolahan Hasil Perikanan I*. Yogyakarta: Liberty.
- Hadiwiyoto, S. 2000. Optimasi Aktivitas Proteolitik Daging Ikan Untuk Produksi Protein Hidrolisat. *Laporan Penelitian*. Jurusan Teknologi Pengolahan Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Handayani, W., Hariadi, S., Santoso, A. B., dan Safi'udin. 2003. Produksi Kecap Ikan secara Enzimatis dari Bahan Baku Ikan Rucah. *Warta Pengabdian-LPPM Unej*. **8**: 57-60.
- Handayani, W., dan Ratnadewi, A. A. I. 2005. Peranan Enzimologi Dalam Pembangunan Industri Rumah tangga Kecap Ikan. *Prosiding Seminar Nasional Basic Science II FMIPA Unibraw*. Malang 26 Februari 2005.
- Hanford, J. 1967. The Proteolytic Enzymes on Wheat and Flour and Their Effect on Bread Quality in the United Kingdom. *Cereal Chemistry*. **44**: 499-511.
- Harrach, T., Eckert, K., Maurer, R. H., Machleidt, I., Machleidt, W., and Nuck, R. 1998. Isolation and Characterization of Two Forms of an Acidic Bromelain Stem Proteinase. *Journal of Protein Chemistry*. **17**: 351-361.
- Hoyle, N. T., and Merrit, J. H. 1994. Quality of Fish Protein Hydrolysates from Herring (*Clupea harengus*). *Journal of Food Science*. **59**: 76-79.
- Hudaya, S., dan Daradjat, S. 1981. *Dasar-Dasar Pengawetan*. Departemen Pendidikan Dan Kebudayaan R. I. Jakarta.
- Keenan, C. P., and Shaklee, J. B. 1985. Electrophoretic Identification of Raw and Cooked Fish Fillet and Other Marine Products. *Food Technology in Australia*. **37**: 117-124, 126-128.
- Kristinsson, H. G., and Rasco, B. A. 2000a. Kinetics of the Hydrolysis of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Muscle Proteins by Alkaline Proteases and a Visceral Serine Protease Mixture. *Process Biochemistry*. **36**: 131-139.
- Kristinsson, H. G., and Rasco, B. A. 2000b. Biochemical and Functional Properties of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Muscle Proteins Hydrolyzed with Various Alkaline Proteases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **48**: 657-666.
- Kusumaningsih, D. 2003. Studi Hidrolisis Protein Daging Ikan Lemuru (*Sardinella* sp.) Oleh Ekstrak Kulit Buah Nanas (*Ananas comosus* Var. *dulcis*) Terhadap Variasi Waktu Inkubasi. *Skripsi*. Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember. Jember.
- Lehninger, A. L. 1997. *Dasar-Dasar Biokimia I*. Ed.5. terjemahan Thenawidjaja. M. dari *Principles of Biochemistry (1982)*. Jakarta: Erlangga.
- Lin, S. -B., Chiang, W. -D., Cordle, C. T., and Thomas, R. L. 1997. Functional and Immunological Properties of Casein Hydrolysate Produced from a Two-Stage Membrane System. *Journal of Food Science*. **62**: 480-483.
- Mathews, C. K., and van Holde, K. E. 1990. *Biochemistry*. Ed.1. Redwood City: The Benjamin/Cummings Publishing Company. Inc.
- Moeljanto. 1992. *Pengalengan Ikan. Penanganan Ikan Segar. Pengawetan Dan Pengolahan Hasil Perikanan*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Plummer, D. T. 1971. *An Introduction to Practical Biochemistry*. Ed.1. New Delhi: Tata McGraw-Hill Publishing Company Ltd.
- Silverstein, R. M., and Kezdy, F. J. 1975. Characterization of the Pineapple Stem Proteases (Bromelains). *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **167**: 678-686.
- Subagio, A., Windrati, W. S., Fauzi, M., dan Witono, Y. 2005. Pengaruh Asam Askorbat Terhadap Pembentukan Gel Miofibril Ikan Mata Besar (*Selar crumenophthalmus*). *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan XVI*: 126-132.
- Suhartono, M. T. 1992. *Protease*. Pusat Antar Universitas Pangan Dan Gizi Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Whitaker, J. R. 1994. *Principles of Enzymology for the Food Sciences*. Ed.2. New York: Marcel Dekker. Inc.
- Winarno, F. G. 1980. *Kimia Pangan Dan Gizi*. Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama.
- Winarno, F. G. 1993. *Pangan. Gizi. Teknologi Dan Konsumen*. Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama.