

AKTIVITAS ANTIOKSIDAN HIDROLISAT PROTEIN MIOFIBRIL BELUT (*Synbranchus bengalensis*) YANG DIHIDROLISIS DENGAN ENZIM PAPAINE

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF EEL MYOFIBRILLAR PROTEIN HYDROLYSATES HYDROLYZED WITH PAPAINE ENZYME

Arlina Hidayati*, Joko Santoso, dan Desniar

Departemen Teknologi Hasil Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor
Kampus IPB Darmaga, Bogor, Jawa Barat, Indonesia
Email: arlinahidayati23@gmail.com

Makalah: Diterima 22 Maret 2019; Diperbaiki 19 November 2019; Disetujui 13 Desember 2019

ABSTRACT

Protein hydrolysates contain bioactive peptides which have several function in order to maintain health and reduce the risk of disease. One of the functions of bioactive peptides is as an antioxidant. This study aims to characterize eel myofibril (*Synbranchus bengalensis*), determine the effect of papain enzyme ratio and hydrolysis time on eel myofibril protein hydrolysates, determine the antioxidant activity of eel myofibril hydrolysates by using DPPH and reducing power assay, and characterize the hydrolysate of myofibril proteins which have the best antioxidant activity. The results showed that eel myofibril protein contained moisture, fat, protein and ash of 85.91, 0.15, 0.14 and 12.78% respectively and contained the highest glutamic acid and lysine. Hydrolysates of eel myofibril proteins treated using various enzyme ratio and hydrolysis time had hydrolysates yields ranging from 3.53-9.68%, the value of hydrolysis degrees 5.20 - 16.193%, IC_{50} 14.24 - 30.26 mg/mL for DPPH assay and absorbance 0.125 - 0.190 at a concentration of 5 mg/mL for reducing power assay. Hydrolysis eel myofibril protein using ratio papain 0.20:100 for 2 hours produced the highest antioxidant activities measuring by DPPH scavenging and reducing power iron. The hydrolysate had molecular weight approximately 19.51 kDa. Glutamic acid and lysine became the dominant amino acids of the hydrolysate.

Keywords: antioxidant, hydrolysates, myofibril, *Synbranchus bengalensis*, papain

ABSTRAK

Hidrolisat protein mengandung peptida bioaktif yang berfungsi untuk menjaga kesehatan dan mengurangi resiko terhadap penyakit. Salah satu fungsi peptida bioaktif adalah sebagai antioksidan. Penelitian ini bertujuan untuk mengkaraktisasi miofibril belut (*Synbranchus bengalensis*), menentukan pengaruh rasio enzim papain dan lama waktu hidrolisis terhadap hidrolisat protein miofibril belut, menentukan aktivitas antioksidan hidrolisat miofibril belut (uji DPPH dan *reducing power*), dan mengkaraktisasi hidrolisat protein miofibril yang memiliki aktivitas antioksidan terbaik. Hasil penelitian menunjukkan bahwa miofibril belut memiliki kadar protein, kadar lemak, kadar air dan kadar abu berturut turut yaitu 85,91; 0,15; 0,14 and 12,78% serta mengandung asam amino tertinggi yaitu asam glutamat dan lisin. Hidrolisat protein miofibril belut dengan perlakuan perbedaan rasio enzim dan lama hidrolisis memiliki rendemen berkisar antara 3,53 – 9,68%, nilai derajat hidrolisis 5,20 – 16,193%, IC_{50} 14,24 – 30,26 mg/mL (uji DPPH) dan absorbansi 0,125 – 0,190 pada konsentrasi 5 mg/mL (uji *reducing power*). Hidrolisat dengan aktivitas antioksidan tertinggi diperoleh dengan rasio enzim 0,20:100 dan lama hidrolisis 2 jam. Hidrolisat memiliki berat molekul kurang dari 19,51 kDa serta memiliki komposisi asam amino tertinggi yaitu asam glutamat dan lisina.

Kata kunci: antioksidan, hidrolisat, miofibril, *Synbranchus bengalensis*, papain

PENDAHULUAN

Belut (*Synbranchus bengalensis*) merupakan jenis ikan yang hidup dengan iklim subtropis hingga tropis dan tersebar luas di berbagai negara Asia termasuk Indonesia (Khanh dan Ngan, 2010). Belut memiliki kandungan gizi yang diperlukan tubuh yaitu protein, lemak, fosfor, kalsium, zat besi, dan vitamin (Palupi *et al.*, 2014). Protein merupakan salah satu kandungan nutrisi belut yang tergolong tinggi yaitu mencapai 81,25% (Herawati *et al.*, 2018), sehingga belut dapat berpotensi sebagai bahan baku hidrolisat protein.

Hidrolisat protein merupakan produk yang dihasilkan dari proses pemotongan polipeptida protein menjadi peptida dengan berat molekul rendah (Srikanya *et al.*, 2017). Hidrolisat protein telah dimanfaatkan sebagai sumber nutrisi (Kiewiet *et al.*, 2018), meningkatkan karakteristik produk (Normah dan Noorasma, 2015), dan *flavor enhancer* (Vijaykrishnaraj *et al.*, 2016). Selain itu, hidrolisat protein mengandung bioaktif peptida yang memiliki aktivitas biologis bagi tubuh sehingga berpotensi sebagai pangan fungsional dan nutrasetikal (Balti *et al.*, 2011).

Peptida bioaktif merupakan peptida dengan urutan asam amino spesifik (Ovando *et al.*, 2018), terdiri dari 2 – 20 sekuen asam amino dan memiliki fungsi fisiologi bagi tubuh (Chandrasekara dan Shahidi, 2011). Beberapa penelitian menunjukkan peptida bioaktif memiliki fungsi sebagai inhibitor tirosinase (Ochiai *et al.*, 2016), anti-inflamasi (Leo *et al.*, 2016), antioksidan (Mirzaei *et al.*, 2018), antiobesitas (Mudgil *et al.*, 2018), antikanker (Vilcacundo *et al.*, 2018), antihipertensi (Guan *et al.*, 2018), antidiabetes (Harnedy *et al.*, 2018), antimikroba (Farzaneh *et al.*, 2018), dan antitrombotik (Qiao *et al.*, 2018).

Salah satu fungsi penting peptida bioaktif yaitu sebagai antioksidan. Antioksidan merupakan senyawa yang dapat melindungi sel tubuh dari kerusakan akibat radikal bebas (Boligon *et al.*, 2014). Sel tubuh yang mati dapat menyebabkan kerusakan jaringan dan berbagai penyakit kronis seperti arteroklorosis, diabetes, kanker, dan neurodegeneratif (Cheung *et al.*, 2015).

Hidrolisat protein yang mengandung peptida bioaktif antioksidan dapat diproduksi dengan hidrolisis secara kimia maupun enzimatik. Proses hidrolisis secara kimia merupakan hidrolisis dengan asam atau basa, dan memiliki beberapa kelemahan. Suhu tinggi yang digunakan selama hidrolisis dapat merusak beberapa asam amino seperti treonin, sistein, lisin, tirosin dan arginin serta proses netralisasi pH dapat menghasilkan garam berlebih (Aspevik, 2016). Proses hidrolisis enzimatik menggunakan enzim proteolitik untuk memotong secara spesifik rantai peptida (Ovissipour *et al.*, 2009) sehingga menghasilkan hidrolisat tanpa kehilangan banyak asam amino esensial (Wijayanti *et al.*, 2015) dan memiliki bioaktivitas yang baik terutama aktivitas antioksidan (Klomklao *et al.*, 2013). Aktivitas antioksidan hidrolisat dengan hidrolisis enzimatik dipengaruhi oleh jenis enzim, kondisi hidrolisis dan bahan baku protein yang digunakan. Pemilihan jenis enzim merupakan faktor penting, karena jenis enzim yang berbeda mempunyai perbedaan spesifitas dan menghasilkan karakteristik hidrolisat yang berbeda (Slizyte *et al.*, 2005). Papain merupakan salah satu enzim yang berasal dari tanaman yang telah banyak digunakan untuk memproduksi hidrolisat protein yang memiliki aktivitas antioksidan (Najafian dan Babji, 2015).

Berdasarkan kelarutannya, protein ikan dapat diklasifikasikan menjadi protein miofibril, sarkoplasma, dan stroma. Protein miofibril merupakan komponen utama protein yang mencapai 66 – 77% dari total protein dan memiliki karakteristik fungsional yang menguntungkan untuk pangan. Karakteristik fungsional protein miofibril meliputi pembentukan gel (Tahergorabi *et al.*, 2011), *solubility*, *foam capacity*, dan *emulsion capacity* (Cercel *et al.*, 2015). Selain mempunyai sifat fungsional, protein miofibril mempunyai sifat biologis sebagai antioksidan. Beberapa penelitian

menunjukkan bahwa hidrolisat miofibril memiliki aktivitas antioksidan yang baik. Ren *et al.* (2010), telah melakukan penelitian aktivitas antioksidan dari hidrolisat miofibril ikan Karper. Ghassem *et al.* (2014), telah membuktikan hidrolisat protein miofibril ikan Patin memiliki aktivitas antioksidan yang baik. Najafian dan Babji (2015), telah mengisolasi peptida yang memiliki aktivitas antioksidan dari miofibril ikan Patin. Bahan baku yang berbeda memiliki kandungan kimia yang berbeda (Petrova *et al.*, 2018) sehingga optimasi proses hidrolisis sangat penting untuk menghasilkan hidrolisat yang mengandung peptida bioaktif dengan aktivitas antioksidan yang tinggi (Centenaro *et al.*, 2011). Optimasi diperlukan untuk mengendalikan kondisi hidrolisis meliputi lama hidrolisis, suhu, rasio enzim dan pH (Roslan *et al.*, 2014). Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian tentang potensi hidrolisat protein miofibril belut rawa (*Synbranchus bengalensis*) sebagai antioksidan yang dihidrolisis menggunakan enzim papain dengan rasio enzim papain dan lama hidrolisis sebagai faktor kajian. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan data karakterisasi protein miofibril belut rawa (*Synbranchus bengalensis*), pengaruh rasio enzim papain dan lama hidrolisis terhadap hidrolisat protein miofibril belut (*Synbranchus bengalensis*), memperoleh data aktivitas antioksidan hidrolisat miofibril belut rawa (*Synbranchus bengalensis*), dan karakterisasi hidrolisat protein miofibril yang memiliki aktivitas antioksidan tertinggi.

BAHAN DAN METODE

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah belut rawa (*Synbranchus bengalensis*), NaCl, dan enzim papain.

Preparasi Protein Miofibril Belut (Wang *et al.*, 2013b)

Preparasi miofibril belut berdasarkan penelitian Wang *et al.* (2013) dengan modifikasi. Protein miofibril belut dipreparasi melalui tiga kali proses pencucian. Pencucian pertama dan kedua dilakukan dengan penambahan daging belut lumat dengan akuades perbandingan 1:3 dan dihomogenisasi selama 5 menit. Homogenat disentrifugasi dengan kecepatan 5000xg suhu 4°C selama 20 menit. Supernatan dipisahkan dan pelet didehidrasi dengan menggunakan kain blacu. Pencucian ketiga, pelet disuspensikan dengan akuades 1:3 dan ditambahkan NaCl 0,3%, kemudian dihomogenisasi dan difiltrasi dengan menggunakan saringan dengan mesh 1 mm untuk memisahkan jaringan ikat. Kemudian filtrat disentrifugasi. Pelet didehidrasi dengan pengepresan dengan menggunakan kain blacu. Pelet yang telah didehidrasi merupakan konsentrat protein miofibril.

Analisis Kandungan Kimia Bahan (AOAC 2005)

Analisis kimia bahan baku belut rawa (*Ophisternon bengalense*) berdasarkan analisis proksimat AOAC (2005) meliputi kadar air, kadar abu, kadar protein, dan kadar lemak.

Hidrolisis Protein Miofibril Belut (Wang et al. 2013b)

Hidrolisis protein miofibril belut rawa (*Synbranchus bengalensis*) berdasarkan metode Wang et al. (2013). Hidrolisis dilakukandengan penambahan enzim papain pada rasio enzim dan protein miofibril 0,1:100; 0,15:100; 0,20:100 ke dalam protein miofibril belut dengan pelarut bufer fosfat (1:3 0,02 M) pada suhu 50°C dan pH 7,0 dengan lama hidrolisis 2, 4 jam dan 6 jam. Setelah waktu hidrolisis tercapai, dilakukan inaktivasi protease pada suhu 85°C selama 15 menit dan disentrifugasi pada kecepatan 4800x g, suhu 4 °C selama 30 menit. Supernatan kemudian dikeringkan dengan *freeze drier*.

Penentuan derajat hidrolisis (Adler-Nissen1986)

Derajat hidrolisis ditentukan berdasarkan metode Adler-Nissen 1986 dengan pengendapan *Trichloroacetic acid* (TCA) 20% untuk menghasilkan 10% fraksi protein terlarut dan 10% fraksi tidak larut. Sebanyak 20 mL sampel ditambah dengan 20 mL TCA 20% kemudian diinkubasi pada selama 30 menit dan suhu 37°C. Selanjutnya campuran disentrifugasi dengan kecepatan 7800xg selama 15menit. Supernatan sampel dianalisis dengan metode *Kjeldahl*.

DPPH Radical Scavenging Activity (Wu et al., 2003)

Analisis aktivitas antioksidan menggunakan radikal DPPH berdasarkan Wu et al. (2003). Larutan sampel 1,5 mL ditambahkan 1,5 mL 0,15 mM DPPH dalam etanol 95%. Kemudian diinkubasi pada ruang gelap suhu 37°C selama 30 menit dan absorbansi diukur pada λ 517 nm. Absorbansi kontrol diukur dengan cara yang sama dengan sampel namun sampel diganti dengan aquades.

Sampel yang digunakan dilarutkan dengan berbagai konsentrasi yang berbeda untuk mendapatkan nilai IC_{50} yang menyatakan besarnya konsentrasi larutan sampel yang dibutuhkan untuk mereduksi radikal bebas DPPH sebesar 50%. Persamaan regresi linear ($y = a + bx$) yang diperoleh dari nilai inhibisi pada setiap konsentrasi digunakan untuk mencari nilai IC_{50} .

Reducing Power (Oyaizu 1988)

Analisis aktivitas antioksidan menggunakan metode *reducing power* berdasarkan Oyaizu et al. (1998). Sampel 1 mL (5mg/mL) ditambahkan 2 mL buffer fosfat 0.2 M (pH 6.6) dan $K_3[Fe(CN)_6]$ kemudian diinkubasi selama 20 menit suhu 50°C. Setelah inkubasi, sampel ditambahkan 1 mL TCA 10% dan disentrifugasi dengan kecepatan 3500xg

selama 10 menit. Supernatan 1 mL ditambahkan 1 mL aquades dan 200 μ L $FeCl_3$. Absorbansi diukur pada λ 700 nm setelah inkubasi pada suhu 37 °C selama 30 menit.

Analisis berat molekul dengan SDS PAGE (Laemmli, 1970)

Analisis berat molekul berdasarkan metode Laemmli (1970). Sampel dilarutkan dalam 5% SDS dan diinkubasi pada suhu 85°C selama 1 jam. Campuran disentrifugasi pada 8500xg selama 5 menit pada suhu kamar. Supernatan yang diperoleh dicampur dengan bufer (Tris HCl 60 mM, pH 6,8, mengandung 2% SDS dan 25% gliserol) dengan rasio 1:10 (v/v) dan mengandung 10% β -merkaptotanol (β -ME). Campuran dipanaskan dalam air mendidih selama 2 menit. Sebanyak 15 μ L sampel dimasukkan ke dalam *gel polyacrylamide* yang terdiri dari 8% *running gel* dan 4% *stacking gel* dan dielektroforesis pada arus konstan 50 mA/gel selama 2 jam. Setelah elektroforesis selesai, gel diwarnai dengan 0,05% (b/v) *coomassie* biru R-250 dalam 15% (v/v) metanol dan 5% (v/v) asam asetat selama 1 jam, kemudian *destained* sampel dengan campuran 30% (v/v) metanol dan 10% (v/v) asam asetat selama 1 jam. *Destained* dilakukan kembali selama 30 menit. Berat molekul protein sampel diperkirakan berdasarkan berat molekul marker (Bio-Rad).

Analisis Profil Asam Amino (AOAC 1995)

Analisis profil asam amino berdasarkan AOAC (1995). Karakterisasi jenis asam amino dilakukan untuk mengetahui jenis asam amino yang terdapat pada sampel. Instrumentasi yang digunakan yaitu UPLC (*Ultra Performance Liquid Chromatography*) Waters 1525 dengan kolom Waters Bondapak NH2 3,9 mm x 300 mm dan fasa gerak yaitu asetonitril : air (60:40). Standar asam amino yang digunakan pada analisis ini terdiri dari 18 jenis asam amino (histidina, isoleusina, leusina, lisina, metionina, fenilalanina, threonina, triptofana, valina, glisina, alanina, arginina, asam aspartat, asam glutamat, prolina, serina, tirosina, dan sisteina). Sejumlah 100 mg sampel ditimbang dan dimasukkan ke dalam tabung ulir dan ditambahkan 5 mL HCl 6 N. Hidrolisis selama 22 jam pada suhu 110°C. lalu diangkat, disaring dengan filter 45 μ m, dan diencerkan dengan akuades dalam labu takar 50 ml. Filtrat 500 μ L ditambahkan 40 μ m AABA dan 460 μ L. Sampel sebanyak 10 μ L ditambahkan 70 μ L AccQ-Fluor Borate Buffer dan 20 μ L AccQ Fluor, vortex, biarkan 1 menit pada suhu kamar, lalu diinkubasi pada suhu 55°C selama 10 menit. Kemudian 1 μ L dimasukkan dalam instrumen UPLC.

Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan yang digunakan pada penelitian ini yaitu Rancangan Acak Lengkap Faktorial. Perlakuan yang digunakan yaitu rasio

enzim dan protein miofibril belut rawa (0,1:100; 0,15:100; 0,20:100) dan lama hidrolisis (2 jam, 4 jam dan 6 jam). Data hasil penelitian yang diperoleh akan dianalisis dengan analisis ragam (ANOVA) dan jika terdapat beda nyata antara taraf perlakuan maka dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (*Tukey*) pada taraf kepercayaan 95%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Komposisi Miofibril Belut

Komposisi kimia daging dan miofibril belut (*Synbranchus bengalensis*) yang diperoleh dengan perlakuan pencucian sebanyak 3 kali dengan penambahan NaCl 0,3% pada pencucian ketigatersaji pada Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi kimia daging dan miofibril belut

Parameter	Daging (%)	Miofibril (%)
Kadar air	80,26 ± 0,03	85,91 ± 0,01
Kadar abu	0,91 ± 0,01	0,14 ± 0,01
Kadar lemak	2,21 ± 0,03	0,15 ± 0,01
Kadar protein	16,08 ± 0,00	12,78 ± 0,02

Tabel 1 menunjukkan komposisi kimia daging belut dan miofibril belut rawa. Hasil analisis komposisi kimia menunjukkan bahwa daging belut yang digunakan pada penelitian ini memiliki komposisi kimia lebih tinggi dibandingkan dengan belut sawah (*Monopterus albus*) pada penelitian Astiana *et al.* (2015), yaitu kadar air 78,90%, kadar abu 0,33%, kadar lemak 0,12%, dan kadar protein 15,90%. Perbedaan komposisi kimia dapat dipengaruhi oleh spesies, habitat, ukuran tubuh kondisi lingkungan, masa pemijahan (Pacheco-Aguilar *et al.*, 2000), umur dan jenis pakan (Yathavamoorthi *et al.*, 2010).

Miofibril belut diperoleh dengan perlakuan pencucian sebanyak 3 kali dengan penambahan NaCl 0,3% pada pencucian ketiga. Selama proses pencucian, lemak pada daging lumat akan terpisah dari daging dan terapung pada permukaan air sehingga miofibril belut memiliki kadar lemak lebih rendah dibandingkan dengan daging. Hal tersebut serupa dengan penelitian Das *et al.* (2015), konsentrasi miofibril mackerel setelah perlakuan pencucian memiliki lebih rendah dibandingkan dengan bahan bakunya. Kadar lemak yang rendah pada miofibril memiliki nilai positif terhadap hidrolisat protein yang dihasilkan. Menurut Yarnpakdee *et al.* (2012), *fishy smell* pada hidrolisat protein ikan dapat disebabkan oleh proses oksidasi lemak yang menyebabkan hidrolisat tidak stabil apabila digunakan sebagai suplemen dan bahan fortifikasi. You *et al.* (2009) menambahkan bahwa oksidasi lemak dapat menyebabkan warna gelap pada hidrolisat protein.

Kadar air miofibril belut lebih tinggi dibandingkan dengan kadar air daging belut. Hal

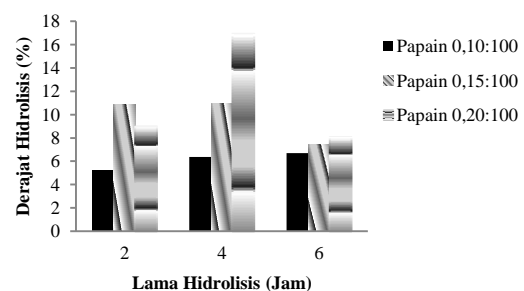
tersebut dapat disebabkan oleh proses hidrasi protein miofibril selama proses preparasi miofibril. Hal tersebut serupa dengan hasil penelitian Lertwittayanon *et al.* (2013) dan Das *et al.* (2015), proses pencucian daging lumat dapat meningkatkan kadar air miofibril ikan barakuda dan ikan mackerel. Menurut Bentis *et al.* (2005), proses pencucian daging lumat dapat meningkatkan hidrasi daging lumat sehingga menyebabkan proses dehidrasi menjadi lebih sulit.

Kadar abu miofibril lebih rendah dibandingkan dengan daging. Kadar abu pada daging merupakan unsur mineral yang terdapat pada daging. Unsur mineral dalam bentuk garam anorganik yang terdapat dalam sarkoplasma, darah dan plasma akan terlarut dalam air selama proses pencucian daging lumat. Menurut Hassan *et al.* (2017) proses pencucian dapat menurunkan kadar abu pada konsentrat miofibril yang dihasilkan karena komponen garam anorganik akan terbuang selama proses pencucian.

Kadar protein miofibril belut lebih rendah dibandingkan dengan kadar protein pada daging. Selama proses preparasi miofibril, terjadi pemisahan antara protein miofibril dengan protein stroma dan protein sarkoplasma. Hal tersebut tidak berbeda dengan penelitian Shekarabi *et al.* (2014), kadar protein mengalami penurunan akibat perlakuan pencucian pada proses preparasi miofibril. Menurut Das *et al.* (2015), persentase kadar protein yang menurun dapat disebabkan hilangnya protein sarkoplasma dan stroma selama proses pencucian. Ismail *et al.* (2010) menambahkan bahwa kadar air yang meningkat akan menurunkan kadar protein dalam konsentrat miofibril yang dihasilkan.

Derajat Hidrolisis

Derajat hidrolisis (DH) merupakan presentase jumlah peptida yang terpotong selama proses hidrolisis (Boutagef *et al.*, 2010). Derajat hidrolisis berpengaruh terhadap berat molekul dan komposisi asam amino yang akan mempengaruhi aktivitas antioksidan peptida yang dihasilkan. Derajat hidrolisis dari hidrolisat miofibril belut tersaji pada Gambar 1.



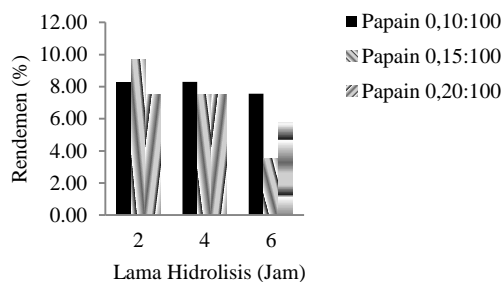
Gambar 1. Pengaruh perbedaan rasio papain dan lama hidrolisis terhadap derajat hidrolisis hidrolisat protein miofibril belut rawa

Perbedaan rasio enzim, lama hidrolisis dan interaksinya memberikan pengaruh yang berbeda pada persentase jumlah pemotongan peptida ($p < 0,05$). Selama proses hidrolisis, enzim papain akan memecah senyawa protein miofibril belut menjadi senyawa peptida dengan berat molekul yang lebih rendah. Menurut Najafian dan Babji (2015), papain mampu memotong lebih banyak peptida pada miofibril ikan patin sehingga menghasilkan konsentrasi peptida yang lebih tinggi dibandingkan dengan enzim alkalase dan flavourenzyme.

Derajat hidrolisis perlakuan rasio papain dan protein miofibril belut rawa 0,2:100 dengan lama hidrolisis 4 jam merupakan kondisi terbaik untuk menghasilkan persentase jumlah peptida terpotong yang tinggi yaitu 16,93%. Nilai derajat hidrolisis padalama hidrolisis 6 jam lebih rendah dibandingkan lama hidrolisis 4 jam. Hal tersebut menunjukkan tahap hidrolisis dari proses hidrolisis protein miofibril belut. Pada tahap pertama nilai DH terus meningkat yaitu pada perlakuan lama hidrolisis 2 dan 4 jam sedangkan setelah 4 jam hidrolisis terjadi fase stabil. Perlakuan lama hidrolisis 6 jam tidak menghasilkan DH yang stabil dan terjadi penurunan nilai DH dapat disebabkan peptida hidrolisat sensitif terhadap suhu dibandingkan peptida yang dihasilkan pada perlakuan lama hidrolisis 2 dan 4 jam. Suhu tinggi yang digunakan pada tahap inaktivasi enzim dapat menyebabkan koagulasi dan presipitasi peptida sehingga menurunkan jumlah peptida dalam hidrolisat. Miofibril mengandung *myosin heavy chain*. Menurut Thorarinsdottir *et al.* (2002), *myosin heavy chain* mudah terdenaturasi dan tidak stabil. Hal tersebut dapat menjadi faktor yang menyebabkan peptida yang dihasilkan dari protein miofibril belut rentan terhadap suhu tinggi sehingga diperlukan metode alternatif inaktivasi enzim yang tidak mempengaruhi stabilitas peptida hidrolisat.

Rendemen Hidrolisat

Rendemen hidrolisat menunjukkan persentase hidrolisat protein yang dihasilkan terhadap berat miofibril belut sebelum hidrolisis. Rendemen hidrolisat miofibril belut dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Pengaruh perbedaan rasio papain dan lama hidrolisis terhadap rendemen hidrolisat miofibril belut

Perbedaan rasio papain dan lama hidrolisis yang berbeda serta interaksi keduanya memberikan pengaruh yang nyata ($p < 0,05$) terhadap rendemen hidrolisat yang dihasilkan. Hidrolisat miofibril belut merupakan jumlah protein terlarut yang dihasilkan selama proses hidrolisis. Perlakuan rasio papain 0,15:100 dengan lama hidrolisis 2 jam menghasilkan rendemen hidrolisat tertinggi namun menurun pada lama hidrolisis 4 dan 6 jam. Penurunan rendemen hidrolisat dapat disebabkan oleh sensitivitas peptida pada suhu tinggi. Proses inaktivasi enzim yang dilakukan pada suhu 85°C dapat menyebabkan agerasi peptida. Inaktivasi enzim dengan pemanasan dapat merubah struktur peptida yang menurunkan peptida bebas dan meningkatkan pembentukan agregat sehingga menurunkan jumlah peptida pada supernatan hidrolisat. Berdasarkan penelitian Foegeding *et al.* (2002), peptida dari protein whey memiliki sensitivitas tinggi terhadap suhu tinggi dan terjadi agregasi pada suhu > 65 °C. Menurut Wijayanti *et al.* (2014), agregasi pada peptida disebabkan agregasi disulfida dan interaksi non kovalen. Creusot *et al.* (2006) menambahkan bahwa agregasi peptide-peptida dapat terbentuk karena interaksi non kovalen pada perlakuan pemanasan suhu 75°C dan 85°C.

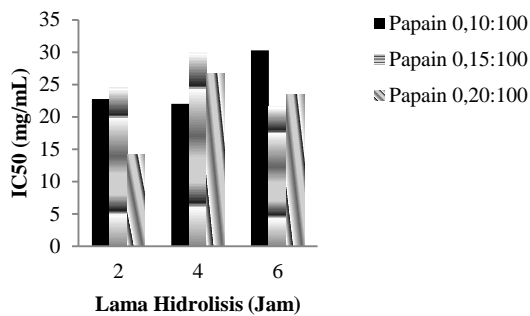
Perlakuan rasio papain 0,15:100 dengan lama hidrolisis 2 jam menghasilkan rendemen hidrolisat tertinggi dibandingkan dengan perlakuan lainnya yaitu 9,68%. Rendemen hidrolisat miofibril belut lebih tinggi dibandingkan dengan hidrolisat dari daging merah tuna yaitu 1,21 g (Parvathy *et al.*, 2018) namun lebih rendah dibandingkan dengan hidrolisat sarden mencapai 7,01 g (Jeevitha *et al.*, 2014). Menurut Awuor *et al.* (2017), perbedaan rendemen hidrolisat dapat dipengaruhi oleh tipe enzim dan substrat, kondisi hidrolisis (pH, suhu, lama hidrolisis, rasio substrat/enzim), dan rasio pelarut.

Aktivitas Antioksidan

Radikal DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) merupakan radikal bebas stabil dengan delokalisasi elektron pada molekulnya (Pisoschi *et al.*, 2009). Apabila DPPH bereaksi pada senyawa donor hidrogen, molekul DPPH akan berubah yang dapat diketahui dari perubahan warna ungu yang memudar hingga berwarna kuning (Thaipong *et al.*, 2006). Aktivitas antioksidan hidrolisat miofibril belut yang dianalisis dengan metode DPPH tersaji pada Gambar 3

Perlakuan perbedaan rasio papain, lama hidrolisis dan interaksinya memberikan pengaruh yang nyata ($p < 0,05$) pada kemampuan hidrolisat miofibril belut menangkap radikal DPPH yang direpresentasikan dengan nilai IC_{50} . Nilai IC_{50} menunjukkan kemampuan senyawa menghambat proses oksidasi sebesar 50%. Nilai IC_{50} yang rendah menunjukkan aktivitas antioksidan yang tinggi. Proses hidrolisis protein oleh enzim papain akan

memotong polipeptida menjadi senyawa yang lebih sederhana. Semakin banyak peptida yang terbentuk akan meningkatkan interaksi radikal DPPH dengan asam amino peptida sehingga menghasilkan senyawa DPPH yang stabil.



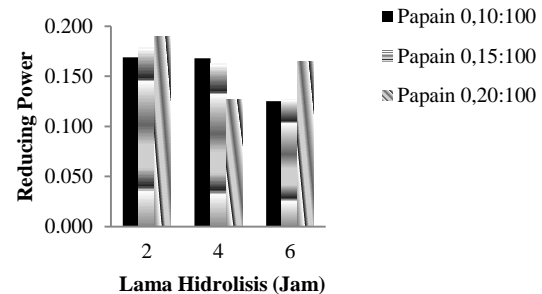
Gambar 3. Pengaruh perbedaan rasio papain dan lama hidrolisis terhadap aktivitas antioksidan hidrolisat miofibril belut dengan pengujian menggunakan DPPH yang ditunjukkan dengan nilai IC₅₀

Nilai IC₅₀ padarasio papain 0,20:100 dengan lama hidrolisis 2 jam memiliki nilai IC₅₀ terendah yaitu 14,24 mg/mL yang menunjukkan aktivitas antioksidan tertinggi. Perlakuan rasio papain 0,20:100 dan lama hidrolisis 2 jam menghasilkan peptida yang memiliki kemampuan mendonorkan hidrogen pada radikal DPPH lebih efektif dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Aktivitas antioksidan dari hidrolisat miofibril belut lebih rendah dibandingkan dengan hidrolisat miofibril patin yang dihidrolisis dengan papain, alkalase dan flavouzyme (Najafian dan Babji, 2015) berturut-turut menghasilkan IC₅₀ 1,12 mg/mL, 2,95 mg/mL dan 1,94 mg/mL. Perbedaan aktivitas antioksidan dapat dipengaruhi oleh berat molekul, jenis asam amino pada rantai samping peptida, dan komposisi asam amino peptida (Najafian dan Babji, 2015).

Perlakuan dengan nilai IC₅₀ terbaik tidak memiliki nilai DH yang tinggi. Menurut Raghavan *et al.* (2008), hidrolisat dengan derajat hidrolisis yang tinggi memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi. Menurut Thianisakul *et al.* (2007), nilai DH hidrolisat ikan *round scad* (*Decapterus maruadsi*) yang semakin tinggi memiliki aktivitas antioksidan semakin tinggi. Berbeda dengan hidrolisat miofibril belut, derajat hidrolisis tertinggi yaitu perlakuan konsentrasi enzim 0,2% dengan lama hidrolisis 4 jam tidak memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi. Menurut Moreno *et al.* (2014), nilai inhibisi DPPH lebih tinggi pada lama hidrolisis yang lebih singkat dapat disebabkan peptida yang memiliki aktivitas antioksidan sudah terbentuk pada awal hidrolisis namun peptida dapat menjadi tidak aktif pada lama hidrolisis yang lebih panjang. Selain itu, menurut Najafian dan Babji (2015) aktivitas inhibisi DPPH dapat dipengaruhi oleh berat molekul jenis asam

amino pada rantai samping peptida, komposisi asam amino.

Keberadaan antioksidan pada sampel menyebabkan reduksi *ferricyanide* kompleks Fe³⁺ menjadi bentuk Fe²⁺ dengan terbentuknya warna biru *Perl's Prussian* pada panjang gelombang 700 nm. Absorbansi yang tinggi menunjukkan aktivitas *reducing power* yang tinggi (Centenaro *et al.*, 2011). Nilai *reducing power* hidrolisat protein miofibril belut tersaji pada Gambar 4.



Gambar 4. Pengaruh perbedaan rasio papain dan lama hidrolisis terhadap aktivitas antioksidan hidrolisat miofibril belut dengan pengujian menggunakan *reducing power* yang ditunjukkan dengan nilai absorbansi pada λ700 nm

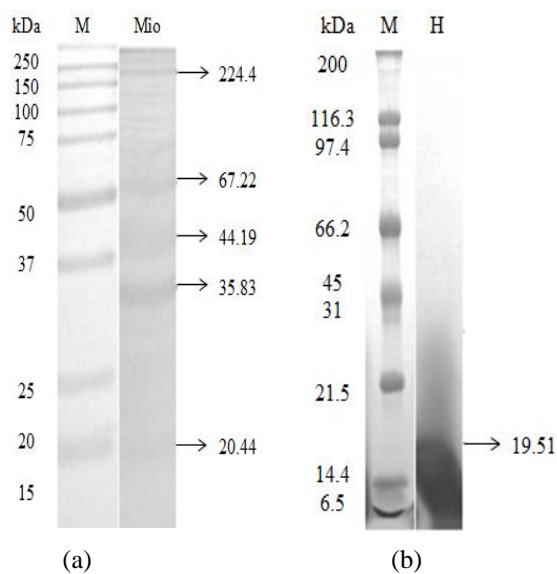
Perbedaan rasio papain dan lama hidrolisis yang berbeda serta interaksi keduanya memberikan pengaruh yang nyata ($p < 0,05$) pada kemampuan hidrolisat miofibril belut mereduksi Fe³⁺ pada konsentrasi hidrolisat 5 mg/mL. Sampel dengan nilai *reducing power* yang tinggi menunjukkan kemampuan hidrolisat mendonorkan elektron pada elemen non radikal bebas seperti logam transisi sehingga mencegah terbentuknya radikal bebas. Menurut (Shahidi dan Zhong, 2015), kemampuan antioksidan sebagai donator elektron tidak hanya bereaksi terhadap radikal bebas tetapi mereduksi elemen dengan elektron valensi tinggi. Potensial redoks atau *reducing power* dari antioksidan merupakan indikator penting aktivitas antioksidan. Jomova dan Valko (2011) menambahkan bahwa logam transisi aktif seperti Fe, Cu, Cr, dan Co mengalami reaksi siklus redoks dan menghasilkan radikal reaktif pada sistem tubuh.

Absorbansi pada perlakuan rasio papain 0,20:100 dengan lama hidrolisis 2 jam berbeda nyata dengan perlakuan lainnya dan memiliki nilai absorbansi tertinggi. Perlakuan rasio papain 0,20:100 dan lama hidrolisis 2 jam menghasilkan peptida yang memiliki kemampuan mendonorkan elektron lebih baik dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Apabila dibandingkan dengan hidrolisat miofibril patin yang dihidrolisis menggunakan papain (Najafian dan Babji, 2015), absorbansi dari hidrolisat miofibril belut lebih rendah yaitu 0,190 pada konsentrasi 5 mg/mL dibandingkan dengan hidrolisat miofibril patin yang mencapai 0,305 pada konsentrasi 3 mg/mL. Perbedaan nilai *reducing*

power dapat disebabkan oleh panjang peptida, sekuen peptida (Thiansilakul *et al.*, 2007) dan jenis asam amino yang terdapat pada hidrolisat seperti asam amino hidrofobik, asam amino yang bersifat asam dan asam amino yang mengandung gugus sulfur yang memiliki kemampuan sebagai agen pereduksi (Udenigwe dan Aluko, 2011).

Karakteristik Hidrolisat Miofibril Belut

Hidrolisat dengan aktivitas antioksidan terbaik yaitu hidrolisat yang diperoleh dari perlakuan rasio enzim 0,20:100 dan lama hidrolisis 2 jam dilakukan analisis lebih lanjut meliputi profil berat molekul dan komposisi asam amino. Berat molekul merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi aktivitas antioksidan. Sampel dengan aktivitas antioksidan terbaik dianalisis profil berat molekul dengan menggunakan elektroforesis SDS PAGE. Profil berat molekul hidrolisat miofibril belut dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Profil berat molekul miofibril belut (a) dan Hidrolisat miofibril belut dengan perlakuan rasio papain 0,20:100 dengan lama hidrolisis 2 jam (b). Miofibril (Mio), hidrolisat miofibril belut (H), marker (M)

Gambar 5 menunjukkan protein miofibril belut memiliki berat molekul yang tinggi. Berat molekul miofibril belut yang teridentifikasi yaitu 224,42 kDa, 67,22 kDa, 44,19 kDa 35,83 dan 20,44 kDa yang diduga merupakan komponen protein miofibril yaitu miosin, aktin dan tropomiosin. Kristinsson dan Rasco (2000), miosin merupakan komponen terbesar pada miofibril mencapai 60%, dan memiliki berat molekul besar yang terdiri dari *myosin heavy chains* (223 kDa) dan *myosin light chains* (22 dan 18 kDa). Menurut Karaulova dan Yakush (2017), berat molekul ikan *myosin light chain* memiliki berat molekul 16 – 27 kDa,

tropomyosin 33 – 36 kDa dan aktin 47 kDa. Hidrolisis miofibril dengan rasio papain 0,20:100 dengan lama hidrolisis 2 jam menyebabkan protein terhidrolisis menjadi peptida yang memiliki berat molekul rendah. Berat molekul hidrolisat miofibril belut rawa yang diperoleh dari perlakuan terbaik telah teridentifikasi dengan berat molekul 19,51 kDa dengan konsentrasi tinggi yang ditandai dengan pita tebal pada hasil elektroforesis SDS PAGE. Menurut Bhaskar dan Mahendrakar (2008), berat molekul rendah menunjukkan hidrolisat ikan memiliki nilai nutrisi yang tinggi dan berpotensi sebagai produk pangan fungsional.

Peptida dengan berat molekul rendah berpotensi memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi. Hidrolisat miofibril belut memiliki peptida dengan berat molekul yang masih tergolong tinggi sehingga belum memiliki kemampuan berinteraksi dengan radikal bebas yang tinggi. Berat molekul rendah pada hidrolisat kolagen sisik ikan croceine croaker (*Pseudosciaena crocea*) sangat berperan pada aktivitas antioksidan pada radikal DPPH dan *reducing power* (Wang *et al.*, 2013b). Semakin rendah berat molekul peptida semakin efektif menghambat reaksi radikal bebas. Berat molekul peptida <3kDa dari hidrolisat miofibril patin memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan dengan peptida dengan berat molekul 10 kDa (Najafian *et al.*, 2013). Berat molekul <3 kDa memiliki peran penting pada aktivitas antioksidan miofibril ikan *grass carp*. Peptida yang memiliki 2 – 10 asam amino memiliki aktivitas antioksidan yang sangat baik (Wang *et al.*, 2013a). Hidrolisat dengan berat molekul yang rendah dapat dengan mudah melewati membran usus sehingga mempercepat efek biologis (Ranathunga *et al.*, 2006), dan lebih mudah dan efektif berinteraksi dengan radikal bebas sehingga dapat menghambat siklus propagasi pada peroksidasi lemak (Wang *et al.*, 2013).

Komposisi asam amino hidrolisat protein sangat berpengaruh terhadap aktivitas antioksidan (Najafian *et al.*, 2013). Komposisi asam amino hidrolisat miofibril belut dengan aktivitas antioksidan terbaik tersaji pada Tabel 2

Hidrolisat miofibril belut dengan aktivitas antioksidan terbaik memiliki komposisi asam amino tertinggi pada asam amino hidrofobik. Komposisi asam amino yang bersifat hidrofobik yang tinggi pada hidrolisat miofibril belut tidak berbeda dengan hidrolisat miofibril patin (Najafian dan Babji 2015). Asam amino hidrofobik pada hidrolisat dapat berpengaruh terhadap aktivitas antioksidan. Sekuen peptida yang mengandung asam amino hidrofobik memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi (Wattanasiritham *et al.*, 2016). Asam amino hidrofobik memfasilitasi interaksi dengan target hidrofobik, seperti membran sel, dan dengan demikian meningkatkan bioavailabilitas (Himaya *et al.*, 2012).

Tabel 2. Komposisi asam amino hidrolisat miofibril belut (g/100g)

Asam amino	Miofibril Belut	Hidrolisat Miofibril Belut*	Kebutuhan Asam amino (berat badan 70 kg)**
Lisin^d	11,39	8,53	2,10
Valin ^a	4,37	4,12	1,82
Isoleusin ^a	4,46	3,84	1,40
Leusin ^a	7,91	7,28	2,73
Triptofan ^c	0,68	0,59	0,28
Histidin ^d	1,83	2,44	0,70
Metionin ^a	3,08	2,62	1,05
Threonin ^e	4,89	4,77	1,05
Fenilalanin ^c	3,88	4,39	1,75
Glisin ^a	3,27	4,37	
Alanin ^a	5,15	4,70	
Arginin ^d	5,83	7,45	
Asam aspartat ^b	8,37	7,11	
Asam glutamat^b	15,37	13,53	
Prolin ^a	2,55	3,19	
Serin ^e	3,85	3,94	
Sistein ^c	0,37	0,31	
Tirosin ^c	3,45	3,94	
AA hidrofobik ^a	30,79	30,14	
AA muatan negatif ^b	23,74	20,64	
AA aromatik ^c	8,01	8,93	
AA muatan positif ^d	19,05	18,42	
AA hidrofilik ^e	9,11	9,02	

Keterangan: *Hidrolisat miofibril dengan rasio papain 0.20:100 dengan lama hidrolisis 2 jam

**FAO (2013), kebutuhan asam amino untuk dewasa per hari dengan berat badan 70 kg. Kebutuhan asam amino akan lebih rendah pada berat badan kurang dari 70 kg dan lebih tinggi pada ibu hamil dan anak-anak.

Selain itu, peptida hidrofobik dapat melindungi oksidasi pada makromolekul dengan menyumbangkan proton/elektron ke radikal reaktif (Chi *et al.*, 2015). Hidrolisat miofibril belut memiliki kandungan asam amino dominan yaitu asam glutamat (13,53%) dan lisin (8,53%). Menurut Yazdi *et al.* (2012), residu asam glutamat (E) pada peptida memiliki pengaruh penting pada aktivitas antioksidan. Menurut Feng *et al.* (2018), asam glutamat berpengaruh terhadap aktivitas antioksidan dengan cara memproduksi asam glutamat yang teroksidasi pada proses penghilangan atau reduksi hidrogen peroksida. Hidrogen peroksida merupakan senyawa penting dalam proses pembentukan radikal bebas. Aktivitas antioksidan tidak hanya dipengaruhi oleh jenis asam amino dan komposisi asam amino tetapi dapat dipengaruhi oleh posisi asam amino pada sekuen peptida, struktur sekunder peptida, asam amino pada N-terminal dan C-terminal (Zou *et al.* 2016), stabilitas peptida terhadap panas (Hou *et al.* 2014) dan pencernaan (Borawska *et al.* 2015) serta efek sinergisme antar peptida (Song *et al.* 2015).

Hidrolisat protein miofibril belut mengandung asam amino esensial yang dapat mencukupi kebutuhan asam amino untuk orang dewasa. Asam amino lisin merupakan asam amino esensial dominan pada hidrolisat miofibril belut.

Kandungan asam glutamat yang tinggi pada hidrolisat dapat memberikan rasa umami sehingga dapat digunakan sebagai *flavour enhancer*. Oleh karena itu, hidrolisat miofibril belut selain berfungsi sebagai sumber antioksidan, hidrolisat miofibril belut dapat memenuhi kebutuhan asam amino esensial dan sebagai alternatif *flavour enhancer* pada pangan.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Miofibril belut memiliki kandungan protein, lemak dan abu yang lebih rendah dibandingkan dengan daging belut, sedangkan kandungan air terjadi sebaliknya. Miofibril belut memiliki kandungan asam glutamat dan lisin tertinggi. Perlakuan perbedaan rasio enzim papain dan lama hidrolisis berpengaruh nyata terhadap derajat hidrolisis, rendemen hidrolisat dan aktivitas antioksidan. Perlakuan rasiopapain dan miofibril belut 0.20:100 dengan lama hidrolisis 4 jam memiliki aktivitas antioksidan terbaik (metode DPPH dan *reducing power*). Karakteristik hidrolisat dengan aktivitas antioksidan terbaik memiliki berat molekul kurang dari 19,51 kDa serta memiliki komposisi asam amino tertinggi yaitu asam glutamat dan lisin.

Saran

Proses purifikasi hidrolisat protein perlu dilakukan untuk mendapatkan aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dan mengetahui sekuen peptida yang berperan sebagai antioksidan. Perlu dilakukan pengujian aktivitas antioksidan hidrolisat belut yang dihidrolisis dengan menggunakan enzim yang berbeda.

DAFTAR PUSTAKA

- Adler-Nissen J. 1986. *Enzymic hydrolysis of food proteins*. London: Elsevier Applied Science Publisher.
- [AOAC] Association of Official Analytical Chemist. 1995. *Official Methods of Analysis*. Washington (USA): The Association of Official Analytical Chemist Inc.
- [AOAC] Association of Official Analytical Chemist. 2005. *Official Methods of Analysis (18 Edn)*. Mayland (USA): Association of Official Analytical Chemist Inc.
- Aspevik T. 2016. Fish protein hydrolysate based on atlantic salmon by-products [disertasi]. Bergen (NO): University of Bergen.
- Astiana I, Nurjanah, Suwandi R, Suryani AA, Hidayat T. 2015. Pengaruh penggorengan belut sawah (*Monopterus albus*) terhadap komposisi asam amino, asam lemak, kolesterol dan mineral. *Depik*. 4(1): 49-57. Doi: [10.13170/depik.1.1.2366](https://doi.org/10.13170/depik.1.1.2366).
- Awuor OL, Kirwa ME, Jackim MF, Betty M. 2017. Optimization of alcalase hydrolysis conditions for production of dagaa (*Rastrineobola Argentea*) protein hydrolysate with antioxidative properties. *Ind Chem*. 3(1): 1-6. Doi: 10.4172/2469-9764.1000122.
- Balti R, Bougatef A, Hadj A.. 2011. Comparativestudy on biochemical properties and antioxidative activity of cuttlefish (*Sepia officinalis*) Protein hydrolysates produced by alcalase and *Bacillus licheniformis* NH1 proteases. *J Amino Acids*: 1-9. Doi: 10.4061/2011/107179.
- Bentis CA, Zotos A, Petridis D. 2005. Production of fish-protein products (surimi) from small pelagic fish (*Sardinops pilchardus*) underutilized by the industry. *J Food Eng*. 68:303–308. Doi: [10.1016/j.jfoodeng.2004.06.003](https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.06.003).
- Bhaskar N, Mahendrakar NS. 2008. Protein hydrolysate from visceral wastes proteins of catla (*Catla catla*): optimization of hydrolysis conditions for commercial neutral protease. *Bioresour Technol*. 99(10): 4105-4111. Doi: [10.1016/j.biortech.2007.09.006](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.09.006).
- Boligon AA, Machado MM, Athayde ML. 2014. Technical evaluation of antioxidant activity. *Med chem*. 4(7): 517-522. Doi: 10.4172/2161-0444.1000188.
- Borawska J, Darewicz M, Pliszkaa M, Vegarud GE. 2015. Antioxidant properties of salmon (*Salmo salar*L.) protein fraction hydrolysates revealed following their *ex vivo* digestion and *in vitro* hydrolysis. *J Sci Food Agric*. 96: 2764–2772. Doi: 10.1002/jsfa.7441.
- Boutagef A, Arroume NN, Manni L, Ravallec R, Barkia A, Guillochon D, Nasri, M. 2010. Purification and Identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of Sardinella (*Sardinella aurita*) by-product protein. *Food Chem*. 118(3): 559–565. Doi: [10.1016/j.foodchem.2009.05.021](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.05.021).
- Centenaro GS, Salas-Mellado M, Pires C, Batista I, Nunes M L, Prentice C. 2011. Antioxidant activity of protein hydrolysates of fish and chicken bones. *Adv J Food Sci and Technol*. 3(4): 280-288. Doi: DJ2012066739.
- Cercel F, Stroiou M, Alexe P, Ianitchi D. 2015. Characterization of myofibrillar chicken breast proteins for obtain protein films and biodegradable coatings generation. *Agriculture Agricultural Sci Proced*. 6 (1): 197 – 205. Doi: [10.1016/j.aaspro.2015.08.059](https://doi.org/10.1016/j.aaspro.2015.08.059)
- Chandrasekara A, Shahidi F. 2011. Inhibitory activities of soluble and bound millet seed phenolics on free radicals and reactive oxygen species. *J. Agric. Food Chem*. 59: 428–436. Doi: 10.1021/jf103896z.
- Cheung RC, Ng Tzi B, Wong JH. 2015. Marine peptides: bioactivities and applications. *Mar. Drugs*. 13(7): 4006-4043. Doi: [10.3390/md13074006](https://doi.org/10.3390/md13074006).
- Chi CF, Hu FY, Wang B, Li ZR, Luo HY. 2015. Influence of amino acid compositions and peptide profiles on antioxidant capacities of two protein hydrolysates from skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) dark muscle. *Mar. Drugs*. 13: 2580-2601. Doi: [10.3390/md13052580](https://doi.org/10.3390/md13052580).
- Creusot N, Gruppen H, Van Konningsveld GA, de Kruif CG, Voragen AGJ. 2006. Peptide-peptide and protein-peptide interactions in mixtures of whey protein isolate and whey protein isolate hydrolysates. *Int Dairy J*. 16: 840-849. Doi: [10.1016/j.idairyj.2005.06.010](https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.06.010).
- Das N, Khuntia BK, Raychaudhuri U, Dora KC, Ganguly S. 2015. Effect of water washing on the functional properties of fish meat. *IJMMTD*. 1(1): 8-12. Doi: 10.18231.
- [FAO] Food and Agricultural Organization. 2013. *Dietary Protein Quality Evaluation in Human Nutrition. Report Of An Fao Expert*

- Consultation*. Roma (IT): Food and Agricultural Organization of the United Nations.
- Farzaneh P, Khanahamadi M, Ehsani M. R, Sharifan A. 2018. Bioactive properties of *Agaricus bisporus* and *Terfezia clavaryi* proteins hydrolyzed by gastrointestinal proteases. *LWT-Food Sci and Technol*. 91: 322-329. Doi: [10.1016/j.lwt.2018.01.044](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.01.044).
- Feng YX, Ruan GR, Jin F, Xu J, Wang FJ. 2018. Purification, identification, and synthesis of five novel antioxidant peptides from Chinese chestnut (*Castanea mollissima* Blume) protein hydrolysates. *LWT- Food Sci and Technol*. 92: 40-46. Doi: [10.1016/j.lwt.2018.01.006](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.01.006).
- Foegeding EA, Davis JP, Doucet D, KMcGuffey M. 2002. *Advances in modifying and understanding whey protein functionality*. *Trends in Food Sci & Technol*. 13(5):151-159. Doi: [10.1016/S0924-2244\(02\)00111-5](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(02)00111-5).
- Ghassem M, Arihara K, Babji AS, Said M, Ibrahim S. 2015. Purification and identification of ACE inhibitory peptides from Haruan (*Channa striatus*) myofibrillar protein hydrolysate using HPLC-ESI-TOF MS/MS. *Food Chem*. 129: 1770-1777. Doi: [10.1016/j.foodchem.2011.06.051](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.06.051).
- Guan H, Diao X, Jiang F, Han J, Kong B. 2018. The enzymatic hydrolysis of soy protein isolate by Corolase PP under high hydrostatic pressure and its effect on bioactivity and characteristics of hydrolysates. *Food Chem*. 245: 89-96. Doi: [10.1016/j.foodchem.2017.08.081](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.081).
- Harnedy PA, Parthasarathy V, McLaughlin CM, O'Keeffe MB, Allsop PJ, Mcsorley EM, O'Harte FPM, FitzGerald R. 2018. Blue whiting (*Micromesistius poutassou*) muscle hydrolysate with in vitro and in vivo antidiabetic properties. *J Funct Food*. 40: 137-145. Doi: [10.1016/j.jff.2017.10.045](https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.10.045).
- Hassan MA, Balange AK, Senapati SR, Martin XKA. 2017. Effect of different washing cycles on the quality of *Pangasius hypophthalmus* surimi. *Fishery Technol*. 54: 51-59.
- Herawati VE, Nugroho RA, Pinandoyo, Hutabarat J, Prayitno Budi, Karnaradjasa O. 2018. The growth performance and nutrient quality of asian swamp eel *Monopterus albus* in central java indonesia in a freshwater aquaculture system with different feeds. *J Aqua FoodProduct Tech*. 1-9. Doi: [10.1080/10498850.2018.1483990](https://doi.org/10.1080/10498850.2018.1483990).
- Himaya SW, Ryu B, Ngo DH, Kim SK. 2012. Peptide isolated from Japanese flounder skin gelatin protects against cellular oxidative damage. *J. Agric. Food Chem*. 60: 9112-9119. Doi: [10.1021/jf302161m](https://doi.org/10.1021/jf302161m).
- Hou Y, Zhou J, Liu W, Yongxia C, Wu L, Yang G. 2014. Preparation and characterization of antioxidant peptides from fermented goat placenta. *Korean J Food Sci Annual*. 34(5): 769-776.
- Ismail I, Huda N, Ariffin F, Ismail N. 2010. Effects of washing on the functional properties of duck meat. *Intl JPoultry Sci*. 9(6): 556-561. Doi: [10.3923/ijps.2010.556.561](https://doi.org/10.3923/ijps.2010.556.561).
- Jeevitha K, Khora S, Priya KM. 2014. Antioxidant activity of fish protein hydrolysates from *Sardinella longiceps*. *Int J Drug Dev & Res*. 6(4): 137-145. Doi: [10.5851/kosfa.2014.34.6.769](https://doi.org/10.5851/kosfa.2014.34.6.769).
- Jomova K, Valko M. 2011. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*. 283: 65-87. Doi: [10.1016/j.tox.2011.03.001](https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.03.001).
- Karaulova EP dan Yakush EV. 2017. The comparative study of myofibrillar proteins of skeletal muscles of some deep-sea fish species. *J Fish Sci*. 11(2): 1-8. Doi: [10.21767/1307-234X.1000112](https://doi.org/10.21767/1307-234X.1000112).
- Khanh NH dan Ngan HTB. 2010. Current practices of rice field eel *Monopterus albus* (Zuiew, 1793) culture in Vietnam. *Res Institute for Agriculture*. 3: 26- 29.
- Kiewiet MBG, Dekkers R, Ulfman LH, Groeneveld A, de Vos P, Faas MM. 2018. Immunomodulating protein aggregates in soy and whey hydrolysates and their resistance to digestion in vitro infant gastrointestinal model: new insights in the mechanism of immunomodulatory hydrolysates. *Food Funct*. 9: 604-613. Doi: [10.1039/c7fo01537b](https://doi.org/10.1039/c7fo01537b).
- Klomklao S, Benjakul S, dan Kishimura H. 2013. Functional properties and antioxidant activity of protein hydrolysates from toothed ponyfish muscle treated viscera extract from hybrid catfish. *Food Sci Technol*. 48(7): 1483-1489. Doi: [10.1111/jifs.12116](https://doi.org/10.1111/jifs.12116).
- Kristinsson HG, Rasco BA. 2000. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 40(1): 43-81. Doi: [10.1080/10408690091189266](https://doi.org/10.1080/10408690091189266).
- Laemmlli UK. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685. Doi: [10.1038/227680a0](https://doi.org/10.1038/227680a0).
- Leo EEM, Fernández JJA, Campos MRS. 2016. Biopeptides with antioxidant and anti-inflammatory potential in the prevention and treatment of diabetes disease. *Biomed & Pharmacotherapy*. 83: 816-826. Doi: [10.1016/j.biopha.2016.07.051](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.07.051).
- Lertwittayanon K, Benjakul S, Maqsood S, Encanacion AB. 2013. Effect of different

- salts on dewatering and properties of yellowtail barracuda surimi. *Int Aquatic Res.* 5: 1-10. Doi: 10.1186/2008-6970-5-10.
- Mirzaei M, Mirdamadi S, Ehsani MR, Aminlari M. 2018. Production of antioxidant and ACE-inhibitory peptides from *Kluyveromyces marxianus* protein hydrolysate: purification and molecular docking. *J Food and Drug Analysis.* 26: 696-705. Doi: [10.1016/j.jfda.2017.07.008](https://doi.org/10.1016/j.jfda.2017.07.008).
- Moreno PJG, Batista I, Pires C, Bandara NM, Carpio FJE, Guadix A, Guadix EM. 2014. Antioxidant activity of protein hydrolysates obtain from discarded mediterranea fish species. *Food Res Intl.* 65: 469-476. Doi: [10.1016/j.foodres.2014.03.061](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.03.061).
- Mudgil P, Kamal H, Yuen GC, Maqsood S. 2018. Characterization and identification of novel antidiabetic and anti-obesity peptides from camel milk hydrolysates. *Food Chem.* 259: 46-54. Doi: [10.1016/j.foodchem.2018.03.082](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.082).
- Najafian L, Babji. 2015. Isolation, purification and identification of three novel antioxidative peptides from patin (*Pangasius sutchi*) myofibrillar protein hydrolysates. *LWT - Food Sci Technol.* 60: 452-46. Doi: [10.1016/j.lwt.2014.07.046](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.07.046).
- Najafian L, Jafarzade M, Said M, Babji AS. 2013. Biochemical properties and antioxidant activity of myofibrillar protein hydrolysates obtained from patin (*Pangasius sutchi*). *Int J Food Sci Technol.* 48: 2014-2022. Doi: [10.1111/ijfs.12162](https://doi.org/10.1111/ijfs.12162).
- Normah I dan Noorasma M. 2015. Physicochemical properties of mud clam (*Polymesoda erosa*) hydrolysates obtained using different microbial enzymes. *IFRJ.* 22(3): 1103-1111. Doi: 43b2142687e648cb88109098bb5931db.
- Ochiai A, Tanaka S, Tanaka T, Taniguchi M. 2016. Rice bran protein as a potent source of antimelanogenic peptides with tyrosinase inhibitory activity. *J Nat Prod.* 79: 2545-2551. Doi: [10.1021/acs.jnatprod.6b00449](https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b00449).
- Ovando CA, de Carvalho JC, de Melo Pereira GV, Jacques P, Soccol VT, and Soccol CR. 2018. Functional properties and health benefits of bioactive peptides derived from Spirulina: A review. *Food Reviews Int.* 34(1): 34-51. Doi: [10.1080/87559129.2016.1210632](https://doi.org/10.1080/87559129.2016.1210632).
- Ovissipour M, Abedian A, Motamedzadegan A, Rasco B, Safari R, Shahiri H. 2009. The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature in the properties of protein hydrolysates from persian sturgeon (*Acipenser persicus*) viscera. 115(1): 238-242. Doi: [10.1016/j.foodchem.2008.12.013](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.013).
- Oyaizu M. 1988. Antioxidative activities of browning products of glucosamine fractionated by organic solvent and thin-layer chromatography. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi.* 35: 771-775. Doi: [10.3136/nshkk1962.35.11.771](https://doi.org/10.3136/nshkk1962.35.11.771).
- Pacheco-Aguilar R, Lugo-Sanchez ME, Robles-Burgueno MR. 2000. Postmortem biochemical and functional characteristics of Monterey sardine muscle at 0°C. *JFood Sci.* 65: 2586-90. Doi: [10.1111/j.1365-2621.2000.tb15953.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb15953.x).
- Palupi S, Hamidah S, Yuriani. 2014. Upaya peningkatan pendapatankelompok usaha belut melalui variasi hasilolahan dan kemasan di Godean. *Inotek.* 18(1): 109-119.
- Parvathy U, anizam AA, Ninan G, Panda SK, Ravishankar CN. 2018. Characterization of fish protein hydrolysate from red meat of *Euthynnus affinis* and its application as an antioxidant in iced sardine. *J Sci Ind Res.* 77: 111-119. Doi: [123456789/43540](https://doi.org/10.23456789/43540).
- Pisoschi AM, Charegi MC, Danet AF. 2009. Total antioxidant capacity of some commercial fruit juices: electrochemical and spectrophotometrical approaches. *Molecules.* 14(1): 480-493. Doi: [10.3390/molecules14010480](https://doi.org/10.3390/molecules14010480).
- Qiao M, Tu M, Wang Z, Mao FJ, Chen H, Qin L, Du M. 2018. Identification and antithrombotic activity of peptides from blue mussel (*Mytilus edulis*) protein. *Int J Mol Sci.* 19(1): 138-149. Doi: [10.3390/ijms19010138](https://doi.org/10.3390/ijms19010138).
- Ranathunga S, Rajapakse N, Kim SK. 2006. Purification and characterization of antioxidant peptide derived from muscle of conger eel (*Conger myriaster*). *European Food Res Technol.* 222: 310-315. Doi: 10.1007/s00217-005-0079-x.
- Ren J, Wang H, Zhao M, Cui C, Hu X. 2010. Enzymatic hydrolysis of grass carp myofibrillar protein and antioxidant properties of hydrolysates. *Czech J Food Sci.* 28(6): 475-484. Doi: 10.17221/343/2009-CJFS.
- Roslan J, Yunos KFM, Abdullah N, Mazlina S, Kamal M. 2014. Characterizations of fish protein hydrolysates from tilapia (*Oreochromis niloticus*) by products. *Agric Sci Pcedia.* 2:312-319. Doi: [10.1016/j.aaspro.2014.11.044](https://doi.org/10.1016/j.aaspro.2014.11.044).
- Shahidi F dan Zhong Y. 2015. Measurement antioxidant activity. *J Funct Food.* 18: 757-781. Doi: [10.1016/j.jff.2015.01.047](https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.047).
- Shekarabi SPH, Hosseini SE, Soltani M, Kamali A, Valinassab T. 2014. A comparative study on physicochemical and sensory characteristics of minced fish and

- surimi from black mouth croaker (*Atrubucca nibe*). *J AgrSciTech*. 16: 1289-1300. Doi: jast.modares.ac.ir/article-23-3094.
- Slizyte R, Rustad T, dan Storro I. 2005. Enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products: Optimization of yield and properties of lipid and protein fractions. *Process Biochem*. 40(12): 3680-3692. Doi: 10.1016/j.procbio.2005.04.007.
- Song R, Wei RB, Ruan GQ, Luo HY. 2015. Isolation and identification of antioxidant peptides from peptic hydrolysates of half-fin anchovy (*Setipinna taty*). *LWT-Food Sci Technol*. 60: 221-229. Doi: 10.1016/j.lwt.2014.06.043.
- Srikanya K, K Dhanapal, K Sravani, K Madhavi, K Praveen . 2017. A study on optimization of fish protein hydrolysate preparation by enzymatic hydrolysis from tilapia fish waste mince. *Int. J Curr Microbiol App Sci*. (6): 3220-3229. Doi: 10.20546/ijcmas.2017.612.375.
- Tahergorabi R, Hosseini SV, Jaczynski J. 2011. *Food Proteins: Seafood Proteins*. Cambridge (GB): Woodhead Publishing.
- Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, Cisneros-Zevallos L, Byrne DH. 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J Food Composition Analysis*. 19: 669-675. Doi: 10.1016/j.jfca.2006.01.003.
- Thiansilakul Y, Benjakul S, Richards MP. 2011. Effect of myoglobin from Eastern little tuna muscle on lipid oxidation of washed Asian seabass mince at different pH conditions. *J Food Sci*. 76(2): 242-249. Doi: 10.1111/j.1750-3841.2010.01992.x.
- Thorarinsdottir KH, Arason S, Geirsdottir M, Bagason SG, Kristbergsson K. 2002. Changes in myofibrillar proteins during processing of salted cod (*gadus morhua*) as determined by electrophoresis and differential scanning calorimetry. *Food Chem*. 77(3): 377-385. Doi: [10.1016/S0308-8146\(01\)00349-1](http://10.1016/S0308-8146(01)00349-1).
- Udenigwe CC dan Aluko RE. 2011. Chemometric analysis of the amino acid requirements of antioxidant food protein hydrolysates. *Int J Molecular Sci*. 12: 3148-3161. Doi: 10.3390/ijms12053148.
- Vijaykrishnaraj M, Roopa BS, dan Prabhasankar P. 2016. Preparation of gluten free bread enriched with green mussel (*Perna canaliculus*) protein hydrolysates and characterization of peptides responsible for mussel flavour. *Food Chem*. 211: 715-25. Doi: 10.1016/j.foodchem.2016.05.094.
- Vilcacundo R, Miralles B, Carillo W, Hernandez-Ledesma B. 2018. In vitro chemochemopreventive properties of peptides released from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) protein under simulated gastrointestinal digestion. *Food Res Int*. 105: 403-411. Doi: 10.1016/j.foodres.2017.11.036.
- Wang B, Wang YM, Chi CF, Luo HY, Deng SG, Ma JY. 2013a. Isolation and Characterization of Collagen and Antioxidant Collagen Peptides from Scales of Croceine Croaker (*Pseudosciaena crocea*). *Mar Drugs*. 11: 4641-4661. Doi: 10.3390/md11114641.
- Wang H, Zhang F, Cao J, Zhang Q, and Chen Z. 2013b. Proteolysis characteristics of sarcoplasmic, myofibrillar, and stromal proteins separated from grass carp and antioxidant properties of their hydrolysates. *Food Sci. Biotechnol*. 22(2): 531-540. Doi: 10.1007/s10068-013-0111-z.
- Wattanasiritham L, Theerakulkait C, Wickramasekara S, Maier CS, Stevens JF. 2016. Isolation and identification of antioxidant peptides from enzymatically hydrolyzed rice bran protein. *Food chem*. 192:156-162. Doi: 10.1016/j.foodchem.2015.06.057.
- Wijayanti HB, Bansal N, dan Deeth HC. 2014. Stability of whey proteins during thermal processing: a review. *Comprehensive Rev in Food Sci Food Safety*. 13: 1235-1251. Doi: 10.1111/1541-4337.12105.
- Wijayanti I, Romadhon, dan Rianingsih L. 2015. Pengaruh Konsentrasi Enzim Papain terhadap Kadar Proksimat dan Nilai Rendemen Hidrolisat Protein Ikan Bandeng (*Chanos chanos* Forks). *PENA Akuatika Volume 12 (1): 13-23*. Doi: 10.31941/penaakuatika.v12i1.323.
- Wu CH, Chen HM, Sdan hiau CY. 2003. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasticus*). *Food Res Intl*. 36: 949-957. Doi: [10.1016/s0963-9969\(03\)00104-2](http://10.1016/s0963-9969(03)00104-2).
- Yarnpakdee S, Benjakul S, Nalinanon S, Kristinsson HG. 2012. Lipid oxidation and fishy odour development in protein hydrolysate from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) muscle as affected by freshness and antioxidants. *Food Chem*. 132:1781-1788. Doi: 10.1016/j.foodchem.2011.11.139.
- Yathavamoorthi R, Sankar TV, Ravishankar CN. 2010. Effect of ice storage and washing on the protein constituents and textural properties of surimi from *Labeo calbasu* (Hamilton, 1822). *Indian J. Fish*. 57(4): 85-91. Doi: 267967851.

- Yazdi MM, Asoodeh A, Chamani JK. 2012. A novel antioxidant and antimicrobial peptide from hen egg white lysozyme hydrolysates. *J Func Food*. 4(1): 278-286. Doi: [10.1016/j.jff.2011.12.004](https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.12.004).
- YouL, Zhao M, Cui C, Zhao H, Yang B. 2009. Effect of degree of hydrolysis on the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates. *Innovative Food Sci Emerging Technol*. 10(2): 235-240. Doi: [10.1016/j.ifset.2008.08.007](https://doi.org/10.1016/j.ifset.2008.08.007).
- Zou Tang-Bin, Zou, He Tai-Ping, Li Hua-Bin, Tang Huan-Wen, Xia En-Qin. 2016. The structure-activity relationship of the antioxidant peptides from natural proteins. *Molecules*. 21(1): 72-86. Doi: [10.3390/molecules21010072](https://doi.org/10.3390/molecules21010072).