

**STUDI INHIBITOR PROTEASE DARI PLASMA BELUT  
SAWAH (*Monopterus albus*) DAN PERANANNYA DALAM  
MENINGKATKAN KUALITAS SURIMI**

**RODIANA NOPIANTI**



**PROGRAM STUDI ILMU PANGAN  
SEKOLAH PASCASARJANA  
INSTITUT PERTANIAN BOGOR  
BOGOR  
2022**

## **PERNYATAAN MENGENAI DISERTASI DAN SUMBER INFORMASI SERTA PELIMPAHAN HAK CIPTA**

Dengan ini saya menyatakan bahwa disertasi dengan judul “Studi Inhibitor Protease dari Plasma Belut Sawah (*Monopterus albus*) dan Peranannya dalam Meningkatkan Kualitas Surimi” adalah karya saya dengan arahan dari dosen pembimbing dan belum diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka di bagian akhir disertasi ini.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya kepada Institut Pertanian Bogor.

Bogor, Agustus 2022

Rodiana Nopianti  
F261170031

## RINGKASAN

RODIANA NOPIANTI. Studi Inhibitor Protease dari Plasma Belut Sawah (*Monopterus albus*) dan Peranannya dalam Meningkatkan Kualitas Surimi. Dibimbing oleh MAGGY THENAWIDJAJA SUHARTONO, EKOWATI CHASANAH dan SUKARNO.

Ikan dan produk olahannya adalah produk pangan yang mudah mengalami kemunduran mutu (*perishable food*). Salah satu faktor penyebab kemundurannya yaitu proses autolisis oleh enzim protease dikarenakan tingginya kandungan protein pada ikan (15-20%). Salah satu produk olahan perikanan yang mudah mengalami kemunduran mutu yaitu surimi. Surimi adalah produk intermediet yang terbuat dari daging ikan giling yang telah melalui tahap pencucian, penambahan krioprotektan dan proses pembekuan. Permasalahan pada surimi yaitu terjadinya pelunakan gel (*modori*) yang disebabkan oleh enzim jenis protease sistein khususnya katepsin L. Enzim ini tahan terhadap panas, dan optimum bekerja pada suhu 55 °C. Penanganan yang dapat dilakukan yaitu dengan menggunakan inhibitor protease. Pada awalnya industri surimi menggunakan plasma sapi sebagai inhibitor protease, akan tetapi penggunaannya tidak dilanjutkan karena mewabahnya penyakit sapi gila. Industri surimi kemudian menggunakan tepung putih telur, akan tetapi komponen tepung putih telur lebih dominan menghambat protease serin, sedangkan katepsin L merupakan protease sistein. Beberapa penelitian memanfaatkan plasma ikan sebagai inhibitor protease, diantaranya plasma ikan chinook salmon, rainbow trout, chum salmon, dan grass carp, dan hasilnya menunjukkan bahwa plasma ikan mampu menghambat aktivitas enzim protease. Pada penelitian ini digunakan *crude* plasma dan fraksi plasma belut sawah (*Monopterus albus*) sebagai inhibitor protease. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menemukan alternatif inhibitor protease dari ikan air tawar dan mengetahui kemampuan *crude* plasma dan fraksi plasma untuk mempertahankan kualitas surimi ikan nila (*Oreochromis mossambicus*) dari aktivitas enzim protease yang menyebabkan *modori* atau pelunakan gel.

Penelitian ini terdiri dari dua tahap penelitian. Tahap pertama yaitu fraksinasi plasma belut sawah menggunakan etanol 40%. Plasma belut diperoleh dari belut sawah yang masih dalam kondisi hidup dengan cara mensentrifugasi darah belut. *Crude* plasma dan fraksi plasma yang dihasilkan kemudian diuji kemampuannya dalam menghambat aktivitas enzim protease dari golongan protease sistein yang merupakan grup besar enzim katepsin L yaitu enzim papain dan tripsin. Penelitian tahap kedua yaitu mengaplikasikan *crude* plasma dan fraksi plasma ke surimi ikan mujair (*Oreochromis mossambicus*). *Crude* plasma dan fraksi plasma ditambahkan ke surimi dengan konsentrasi 0, 0,25, 0,50, 0,75, 1, 1,5, dan 2 mg/g untuk menghasilkan *modori* gel dan surimi yang terautolisis.

Hasil penelitian tahap pertama menghasilkan informasi kemampuan plasma belut sawah sebagai inhibitor protease. Analisis kadar protein menunjukkan bahwa jumlah protein fraksi plasma lebih tinggi dibandingkan *crude* plasma. *Crude* plasma dan fraksi plasma mampu menghambat aktivitas enzim tripsin dan papain. Nilai IER (*Inhibition Efficiency Ratio*) plasma yang difraksinasi dengan etanol yaitu 128,56 %/mg protein, sedangkan *crude* plasma 65 %/mg protein. Hal ini mengindikasikan keefektivan fraksi plasma sebagai

inhibitor. Dua pita protein dengan perkiraan berat molekul 146 kDa dan 105 kDa terdeteksi di *crude* plasma. Demikian juga pada fraksi plasma yang diperkirakan alfa-2-makroglobulin yang tersusun dari dua subunit dengan berat molekul masing-masing 120 kDa dan 110 kDa.

Hasil tahap kedua menunjukkan bahwa fraksi plasma dapat mempertahankan kekuatan gel, *expressible moisture*, mikrostruktur, kelarutan protein, dan persen penghambatan terhadap autolisis surimi yang disebabkan enzim protease yang menyebabkan modori, lebih baik dibandingkan *crude* plasma. Derajat putih menurun jika konsentrasi plasma yang digunakan meningkat. Profil protein autolisis surimi menunjukkan bahwa intensitas protein miosin meningkat sebesar 10,49% ketika konsentrasi fraksi plasma yang digunakan sebanyak 1,5 mg/g, sedangkan penggunaan *crude* plasma menyebabkan intensitas miosin menurun. Hal ini membuktikan bahwa *crude* plasma mengandung enzim protease yang kemungkinan menyebabkan menurunnya intensitas protein myosin, yang dikonfirmasi juga dari hasil zimogram.

Kesimpulan dari penelitian adalah *crude* plasma dan fraksi plasma belut sawah mampu menghambat aktivitas enzim papain dan tripsin yang satu golongan dengan katepsin L, protease penyebab kerusakan surimi. Aktivitas penghambatan tertinggi dihasilkan oleh fraksi plasma. Hasil SDS-PAGE menunjukkan bahwa pada fraksi plasma terdeteksi pita protein yang kemungkinan merupakan alfa-2-makroglobulin yang tersusun dari dua subunit protein. Fraksi plasma yang ditambahkan ke dalam surimi mampu mempertahankan kekuatan gel, *expressible moisture*, mikrostruktur, kelarutan protein, dan nilai persen penghambatan terhadap autolisis surimi ikan mujair lebih baik dibandingkan dengan *crude* plasma. Analisis zimogram membuktikan keberadaan enzim protease pada *crude* plasma dengan terbentuknya dua pita bening. Proses pemurnain lebih lanjut mungkin diperlukan untuk memastikan hasil yang lebih baik dalam penerapan plasma untuk menghasilkan surimi yang berkualitas baik.

Kata kunci: Autolisis, belut sawah, *crude* plasma, fraksi plasma, modori, surimi

## SUMMARY

RODIANA NOPIANTI. Study Inhibitor Protease from Swamp Eel (*Monopterus albus*) Plasma and Its Role in Improving the Quality of Surimi. Supervised by MAGGY THENAWIDJAJA SUHARTONO, EKOWATI CHASANA and SUKARNO.

Fish and its processed products are prone to quality deterioration; therefore, it is classified as perishable food. One of the factors causing the fish deterioration is autolysis process by endogenous protease enzymes due to their high protein content (15-20%). Surimi is one of the fish processed products that are very prone to have quality deterioration. Surimi is an intermediate product made of minced fish meat undergone washing, cryoprotectant addition, and freezing process. The problem with surimi is the softening of the gel (modori) caused by cysteine protease enzymes, especially cathepsin L. This enzyme is heat resistant and works optimally at 55 °C. Application protease inhibitors on surimi processing is one of an important steps used so far in the surimi industries. Initially, cow plasma was used as a protease inhibitor, but its use was discontinued due to mad cow disease. The surimi industry then used egg white powder, but the egg white flour component was more dominant in inhibiting serine proteases, while cathepsin L was a cysteine protease. Several studies have used fish plasma as a protease inhibitor, including chinook salmon, rainbow trout, chum salmon, and grass carp. The results showed that fish plasma could inhibit the activity of protease enzymes. This study used crude plasma and ethanol fractions from swamp eel (*Monopterus albus*) plasma as protease inhibitors. This study aimed to find alternative protease inhibitors from freshwater fish and determine the ability of crude plasma and plasma ethanol fraction to maintain the quality of tilapia surimi (*Oreochromis mossambicus*) from protease enzyme activity that causes modori or gel softening.

This research consists of two stages of research. The first stage was the fractionation process of swamp eel plasma using 40% ethanol. The swamp eel plasma was obtained from alive swamp eels, followed by the centrifugation process. The crude plasma and ethanol fractions of swamp eel plasma produced were then analyzed for their ability to inhibit the activity of protease enzymes, namely papain and trypsin enzymes. The second research stage was applying crude plasma and plasma ethanol fractions to the surimi of tilapia fish (*Oreochromis mossambicus*). Crude plasma and ethanol fractions of swamp eel plasma were mixed with surimi at 0, 0.25, 0.50, 0.75, 1, 1.5, and 2 mg/g to produce modori gel and autolyzed surimi.

Results of the first study shows that the protein content of plasma fraction was higher than the crude plasma. Crude and plasma ethanol fraction could inhibit the activity of trypsin and papain. The value of IER (% inhibition/mg protein) plasma fractionated with ethanol of 128.56 was higher than that of crude plasma of 65 %/mg protein. It indicated the effectiveness of ethanol fraction of swamp eel plasma as a protease inhibitor. Two bands of estimated molecular weight of 146 kDa and 105 kDa were detected in crude plasma. The protein complex, possibly alpha-2-macroglobulin in swamp eel plasma, consists of two subunits with molecular weights of 120 and 110 kDa.

Results of the second stage showed that the plasma ethanol fraction could maintain gel strength, expressible moisture, microstructure, protein solubility, and the percent inhibition of autolysis of surimi caused by protease enzymes that caused modori, better than the crude plasma. The degree of whiteness decreased as the plasma concentration used increased. The protein profile of surimi autolysis showed that myosin protein intensity increased by 10.49% when the plasma fraction concentration was 1.5 mg/g. In contrast, using crude plasma caused the myosin intensity decreased. It proves that crude plasma contains protease enzymes which may cause a decrease in the intensity of myosin protein, and it was also confirmed from zymogram analysis.

The study concluded that the crude plasma and plasma ethanol fraction of swamp eel could inhibit the activity of papain and trypsin enzymes. The plasma ethanol fraction produced the highest inhibitory activity. The results of SDS-PAGE showed that the plasma fraction detected was probably alpha 2-macroglobulin, composed of two protein subunits. Plasma fraction mixed with surimi could maintain gel strength, expressible moisture, microstructure, protein solubility, and the percentage of inhibition on autolysis of tilapia surimi better than crude plasma. The zymogram analysis proved the presence of the protease enzyme with the formation of two clear bands in the *crude* plasma, but not in the fraction. Further purification processes may be required to ensure better results in plasma application to produce good quality surimi.

*Keywords:* Autolysis, crude plasma, modori, plasma ethanol fraction, surimi, swamp eel

© Hak Cipta milik IPB, tahun 2022  
Hak Cipta dilindungi Undang-Undang

*Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan atau menyebutkan sumbernya. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik, atau tinjauan suatu masalah, dan pengutipan tersebut tidak merugikan kepentingan IPB.*

*Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apa pun tanpa izin IPB.*

**STUDI INHIBITOR PROTEASE DARI PLASMA BELUT  
SAWAH (*Monopterus albus*) DAN PERANANNYA DALAM  
MENINGKATKAN KUALITAS SURIMI**

**RODIANA NOPIANTI**

Disertasi  
sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Doktor pada  
Program Studi Ilmu Pangan

**PROGRAM STUDI ILMU PANGAN  
SEKOLAH PASCASARJANA  
INSTITUT PERTANIAN BOGOR  
BOGOR  
2022**



Penguji Luar Komisi Pembimbing pada Ujian Tertutup Disertasi:

- 1 Dr. Herpandi, S.Pi., M.Si.
- 2 Dr. Ir. Endang Prangdimurti, M.Si.

Promotor Luar Komisi Pembimbing pada Sidang Promosi Terbuka Disertasi:

- 1 Herpandi, S.Pi., M.Si., Ph.D
- 2 Prof. Dr. Ir. Joko Santoso, M.Si

Judul Disertasi : Studi Inhibitor Protease dari Plasma Belut Sawah (*Monopterus albus*) dan Peranannya dalam Meningkatkan Kualitas Surimi

Nama : Rodiana Nopianti

NIM : F261170031

Disetujui oleh

Pembimbing 1:

Prof. Dr. Ir. Maggy Thenawidjaja Suhartono



Pembimbing 2:

Prof. Dr. Ir. Ekowati Chasanah, M.Sc.



Pembimbing 3:

Dr. Ir. Sukarno, M.Sc.



Diketahui oleh

Ketua Program Studi:

Prof. Dr. Ir. Harsi D. Kusumaningrum

NIP. 196405021993032004

Dekan Fakultas Teknologi Pertanian:

Prof. Dr. Ir. Slamet Budijanto, M.Agr.

NIP. 196105021986031002

Tanggal Ujian: 27 Juli 2022

Tanggal Lulus: 22 Agustus 2022



Dokumen ini ditandatangani secara elektronik menggunakan sertifikat dari BSRÉ, silahkan lakukan verifikasi pada dokumen elektronik yang dapat diunduh dengan melakukan scan QR Code

## PRAKATA

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah subhanaahu wa ta'ala atas segala karunia-Nya sehingga karya ilmiah ini berhasil diselesaikan. Tema yang dipilih dalam penelitian yang dilaksanakan sejak bulan Juni 2019 sampai bulan Oktober 2021, dengan judul “Studi Inhibitor Protease dari Plasma Belut sawah (*Monopterus albus*) dan Peranannya dalam Meningkatkan Kualitas Surimi”.

Terima kasih penulis ucapkan kepada para pembimbing, Prof. Dr. Ir. Maggy Thenawidjaja Suhartono, Prof. Dr. Ir. Ekowati Chasanah, M.Sc., dan Dr. Ir. Sukarno, M.Sc. yang telah membimbing dan banyak memberi saran dan masukan selama penelitian, publikasi di jurnal ilmiah, hingga dalam penulisan disertasi. Disertasi ini melalui proses penyempurnaan dengan adanya masukan dari para penguji luar komisi, yaitu Herpandi, S.Pi., M.Si., Ph.D., Dr. Ir. Endang Prangdimurti, M.Si. dan Prof. Dr. Ir. Joko Santoso, M.Si.

Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Ketua dan Sekretaris Program Studi Ilmu Pangan, moderator seminar, dan pihak lain yang telah membantu secara langsung dan tidak langsung. Di samping itu, penghargaan penulis sampaikan kepada Prof, Dr. Ir. H. Anis Saggaff, MSCE. Rektor Universitas Sriwijaya yang telah memberikan izin untuk melanjutkan studi S3 dan seluruh staf laboratorium Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan yang telah membantu untuk kelancaran penelitian. Teman-teman seperjuangan yang telah memberikan semangat Lia, Melly, Novi, Bimo, Dini dan Suyanto. Kepada seluruh staf pengajar Prodi. Teknologi Hasil Perikanan Fakultas Pertanian Universitas Sriwijaya juga disampaikan ucapan terima kasih atas perhatiannya. Ungkapan terima kasih saya sampaikan kepada mama (Msy. Rubiatun), alm. papa (Cik Uni), suami (Dik Dik Dwi Prasetya), anak-anak (Fatih dan Falisha), serta adik-adik (Yeni, Faisal, Ria, Kiki) yang telah memberikan dukugan, doa, dan kasih sayangnya.

Semoga karya ilmiah ini bermanfaat bagi pihak yang membutuhkan dan bagi kemajuan ilmu pengetahuan.

Bogor, Agustus 2022

*Rodiana Nopianti*

## DAFTAR ISI

DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	
I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan	3
1.4 Manfaat	3
1.5 Kebaharuan	3
II TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Belut	4
2.2 Surimi	5
2.3 Enzim Protease	6
2.3.1 Protease Serin	8
2.3.2 Protease Sistein	8
2.3.3 Protease Aspartik	9
2.3.4 Metalloprotease	9
2.4. Penggolongan Inhibitor Enzim	9
2.5 Plasma Darah sebagai Inhibitor Protease	10
2.6 Alfa-2-Makroglobulin	12
2.7 Fraksinasi Plasma Darah	14
III METODE	
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	15
3.2 Alat dan Bahan	15
3.3 Prosedur Kerja	15
3.3.1 Fraksinasi <i>Crude</i> Plasma Belut Sawah ( <i>Monopterus albus</i> )	15
3.3.1.1 Preparasi <i>Crude</i> Plasma dan Fraksi Plasma	15
3.3.1.2 Analisis Proksimat	15
3.3.1.2.1 Kadar protein	15
3.3.1.2.2 Kadar Lemak	16
3.3.1.2.3 Kadar Air	16
3.3.1.2.4 Kadar Abu	16
3.3.1.3 Analisis Penghambatan Enzim Papain	17
3.3.1.4 Analisis Penghambatan Enzim Tripsin	17
3.3.1.5 Profil Protein Fraksi Plasma	17
3.3.2 Aplikasi Plasma Belut Sawah ( <i>Monopterus albus</i> ) dalam Menghambat Autolisis Surimi Ikan Mujair ( <i>Oreochromis mossambicus</i> )	19
3.3.2.1 Preparasi Modori Gel Surimi Ikan Mujair ( <i>Oreochromis mossambicus</i> )	19
3.3.2.2 Analisis Kekuatan Gel	20
3.3.2.3 Analisis <i>Expressible Moisture</i>	20
3.3.2.4 Analisis Uji Lipat	20

3.3.2.5 Analisis Kelarutan Protein	20
3.3.2.6 Analisis Derajat Putih	21
3.3.2.6 Scanning electron microscopy (SEM)	21
3.3.2.7 Analisis Autolisis Surimi Ikan Mujair ( <i>Oreochromis mossambicus</i> )	21
3.3.2.7.1 Profil protein autolisis surimi	21
3.3.2.7.2 Persen penghambatan autolisis surimi	21
3.4 Analisis data	22
IV HASIL DAN PEMBAHASAN	23
4.1 Fraksi <i>crude</i> dan plasma belut sawah ( <i>Monopteros albus</i> )	23
4.1.1 Aktivitas Inhibitor Protease <i>Crude</i> Plasma terhadap Enzim Tripsin dan Papain	23
4.1.2 Aktivitas Inhibitor Protease Fraksi Plasma terhadap Enzim Papain	25
4.1.3 Profil protein <i>crude</i> plasma dan fraksi plasma belut sawah	25
4.1.4 Zimogram plasma dan fraksi plasma belut sawah	26
4.1.5. Uji Asam Amino <i>Crude</i> dan Fraksi Plasma Belut Sawah	27
4.2 Pemanfaatan Plasma Belut Sawah ( <i>Monopterus albus</i> ) dalam Menghambat Autolisis Surimi Ikan Mujair ( <i>Oreochromis mossambicus</i> )	28
4.2.1 Proksimat Surimi	28
4.2.2 Karakteristik Tekstur Gel <i>Modori</i> Surimi	29
4.2.3 Uji <i>Expressible Moisture</i> Gel <i>Modori</i> Surimi Ikan Mujair	30
4.2.4 Uji Lipat Gel <i>Modori</i> Surimi Ikan Mujair	31
4.2.5 Mikrostruktur gel modori surimi dengan penambahan <i>crude</i> dan fraksi plasma belut sawah	31
4.2.6 Kelarutan Protein Gel <i>Modori</i> Ikan Mujair	32
4.2.7 Uji Derajat Putih Gel <i>Modori</i> Surimi	33
4.2.8 Inhibisi terhadap Autolisis Surimi Ikan Mujair	33
4.2.8.1 Persen Inhibisi terhadap Autolisis Surimi	33
4.2.8.2 Profil Protein Surimi dengan Penambahan Inhibitor ( <i>Crude</i> dan Fraksi Plasma)	34
V SIMPULAN DAN SARAN	36
5.1 Simpulan	36
5.2 Saran	36
DAFTAR PUSTAKA	36
LAMPIRAN	45
RIWAYAT HIDUP	46

## DAFTAR TABEL

1	Komposisi kimia belut ( <i>Monopterus albus</i> )	4
2	Protease endogen yang terlibat pada pelunakan daging ikan dan <i>shellfis</i>	7
3	Komposisi dan fraksi dari darah	10
4	Protein dalam plasma	11
5	Pemanfaatan plasma darah ikan sebagai inhibitor protease	11
6	Proksimat belut sawah ( <i>Monopterus albus</i> )	23
7	Kadar protein <i>crude</i> dan fraksi plasma belut sawah	23
8	Aktivitas inhibitor protease fraksi plasma belut sawah terhadap enzim papain	25
9	Kandungan asam amino <i>crude</i> dan fraksi plasma belut sawah ( <i>Monopterus albus</i> )	28
10	Proksimat surimi ikan mujair ( <i>Oreochromis mossambicus</i> )	29
11	Nilai <i>expressible moisture</i> gel modori ikan mujair berdasarkan perbedaan konsentrasi dan tipe plasma	30
12	Pengaruh tipe plasma dan konsentrasi inhibitor ( <i>crude</i> plasma dan fraksi plasma) terhadap uji lipat gel <i>modori</i> surimi ikan mujair	31
13	Nilai derajat putih gel modori ikan mujair pada perbedaan konsentrasi plasma dan tipe plasma	33
14	Pengaruh tipe plasma dan konsentrasi inhibitor ( <i>crude</i> dan fraksi plasma) terhadap autolisis surimi ikan mujair	34

## DAFTAR GAMBAR

1	Persentase produksi surimi di Asia	5
2	Mekanisme penghambatan: a). Inhibitor kompetitif, b). Inhibitor non-kompetitif	10
3	Model $\alpha$ -2-M. A. Native $\alpha$ -2-M; B. Perubahan konformasi dari $\alpha$ -2-M (panah kecil di tengah mengindikasikan posisi receptor-recognize sites); C. Protease yang terperangkap oleh $\alpha$ -2-M	12
4	Separuh molekul dari $\alpha$ -2-M	13
5	Alur Proses Penelitian Tahap I	19
6	Diagram analisis penelitian tahap II, (a) gel modori, (b) autolisis surimi	22
7	Aktivitas inhibitor <i>crude</i> plasma belut sawah terhadap enzim tripsin	24
8	Aktivitas inhibitor <i>crude</i> plasma belut sawah terhadap enzim papain	24
9	Profil protein <i>crude</i> dan fraksi plasma belut sawah (1. <i>Crude</i> plasma + merkaptobenzenol, dipanaskan; 2. <i>Crude</i> plasma + merkaptobenzenol, tidak dipanaskan; 3. Marker; 4. Fraksi plasma + merkaptobenzenol, tidak dipanaskan; 5. Fraksi plasma + merkaptobenzenol, dipanaskan)	26
10	Zimogram plasma dan fraksi plasma belut sawah dengan konsentrasi kasein 0,75%	27

11	Kekuatan gel <i>modori</i> surimi ikan mujair pada perbedaan konsentrasi inhibitor dan tipe plasma (angka yang disertai huruf yang berbeda menunjukkan beda nyata pada uji lanjut Duncan ( $P<0,5$ ))	30
12	Mikrostruktur <i>modori</i> gel dengan penambahan <i>crude</i> dan fraksi plasma belut sawah dengan konsentrasi yang berbeda (0, 0,5, 1,5 mg/g)	32
13	Kelarutan protein gel <i>modori</i> surimi ikan mujair pada perbedaan konsentrasi dan tipe plasma (angka yang disertai huruf yang berbeda menunjukkan beda nyata pada uji lanjut Duncan ( $P<0,5$ ))	32
14	Profil protein ( <i>autolysis pattern</i> ) surimi dengan penambahan <i>crude</i> plasma (a), fraksi plasma (b) belut sawah, dipanaskan pada suhu 55 °C dengan konsentrasi yang berbeda (mg/g), dan intensitas/luas area miosin dengan menggunakan image J	35





# I PENDAHULUAN

## 1.1 Latar Belakang

Ikan terkenal dengan kandungan proteinnya yang tinggi. Selain itu, ikan mengandung mineral, vitamin, dan asam lemak tidak jenuh yang baik bagi manusia. Protein dalam ikan mencapai 16-21%, dan ikan mengandung semua asam amino esensial (Petricorena 2014). Pada ikan banyak terkandung enzim protease internal (*endogenous protease*). Protease dapat dibagi menjadi endopeptidase dan exopeptidase berdasarkan sisi protein atau rantai polipeptida yang dipecah/dipotong. Berdasarkan sisi aktif, protease diklasifikasikan menjadi empat kelompok, yaitu serin, sistein, aspartat, dan metalloprotease, seperti yang diusulkan oleh Komisi Enzim dari International Union of Biochemists (Sriket 2014).

Ikan sangat mudah mengalami kerusakan karena kandungan proteinnya yang tinggi, sehingga berkontribusi pada terbatasnya umur simpan ikan dan produk olahannya. Enzim protease internal adalah salah satu penyebab kondisi ini, dan enzim ini terdapat di organ pencernaan dan daging ikan. Singh dan Benjakul (2018) melaporkan bahwa jenis protease yang dominan pada sistem pencernaan dan kulit ikan adalah serin, sedangkan pada daging ikan adalah protease sistein.

Autolisis (*self-digestion*) oleh protease internal terjadi selama penanganan dan penyimpanan post-mortem ikan, dan enzim bekerja tanpa kendali dari inangnya. Felberg *et al.* (2010) melaporkan bahwa fenomena autolisis pada ikan herring (*Clupea harengus*) dan sarden (*Sardina pilchardus*) disebabkan oleh enzim protease, seperti elastase, tripsin, dan aspartil aminopeptidase berdasarkan hasil sekuens parsial peptida yang berasal dari protease. Selain itu, katepsin dan kalpain, anggota kelompok protease sistein, juga menyebabkan terjadinya autolisis dan pelunakan daging ikan. Tang *et al.* (2019) mengkonfirmasi katepsin L sebagai penyebab pelunakan gel atau modori pada gel surimi ikan sturgeon (*Acipenseridae*). Kekuatan gel surimi menurun karena terjadinya hidrolisis protein miosin oleh Katepsin L, yang dikenal sebagai protease sistein lisosom.

Modori yang disebabkan oleh Katepsin L umumnya dapat dievaluasi pada kisaran suhu 50 hingga 70 °C (Tang *et al.* 2019). Park *et al.* (2013) melaporkan bahwa suhu optimum Katepsin L untuk menginduksi pelunakan gel selama pemanasan lambat adalah pada 55 °C, yang merupakan bagian dari proses surimi dalam pembuatan berbagai produk turunan. Oleh karena itu pelunakan gel menjadi masalah dalam industri pengolahan surimi.

Surimi merupakan produk antara yang digunakan untuk membuat produk makanan olahan berbasis gel, beberapa diantaranya yaitu kamaboko, chikuwa, sosis, *fish cake*, dan kepiting imitasi. Surimi terbuat dari ikan giling yang telah mengalami proses pencucian (*leaching*), pengepresan (*dewatering*), pencampuran dengan krioprotektan, dan pembekuan (Park *et al.* 2013). Surimi umumnya dibuat dari ikan laut, seperti pollock, pacific whiting, hoki, south blue whiting, north blue whiting, dan beberapa ikan tropis (threadfin bream, croaker, lizard fish, pike-conger). Pemanfaatan ikan tropis sebagai bahan baku surimi meningkat lebih dari 60% karena permintaan yang meningkat (Jaziri *et al.* 2021). Selain itu, ikan air tawar juga dapat dijadikan sebagai alternatif bahan baku surimi. *Crabsticks* terbuat dari surimi ikan *silver carp* yang merupakan ikan air tawar di Cina.

Beberapa penelitian telah dilakukan untuk mengkaji karakteristik surimi yang dihasilkan dari ikan air tawar (nila, lele, gurame). Studi menunjukkan bahwa ikan air tawar ini dapat menghasilkan kekuatan gel yang baik (Park *et al.* 2013). Surimi harus memiliki karakteristik khusus sebagai bahan penting dalam pembuatan produk berbasis gel. Kekuatan gel dan warna/derajat putih adalah atribut kualitas utama untuk gel surimi yang dimasak (Park *et al.* 2013). Nilai kekuatan gel dipengaruhi oleh bahan baku yang digunakan dan juga dipengaruhi oleh proses pemasakan.

Salah satu cara untuk menghambat aktivitas enzim protease adalah dengan menggunakan inhibitor protease. Studi tentang potensi plasma ikan sebagai inhibitor protease yang digunakan untuk surimi telah dilakukan. Beberapa sumber protease inhibitor yang digunakan adalah plasma salmon (Fowler & Park, 2015a), rainbow trout plasma (Li *et al.* 2008b). Protease inhibitor komersial yang digunakan yaitu putih telur kering, plasma daging sapi dan tepung kentang (Weerasinghe *et al.* 1996). Studi ini menggunakan *crude* plasma dari belut sawah (*Monopterus albus*), yang telah dilaporkan pada studi terdahulu bahwa plasma belut sawah lebih baik dalam menghambat aktivitas protease sistein (papain) dan protease serin (tripsin) dari pada ikan patin (Nopianti *et al.* 2019).

Industri surimi awalnya menggunakan plasma sapi sebagai inhibitor protease, namun penggunaannya dihentikan karena merebaknya penyakit sapi gila. Industri surimi kemudian menggunakan tepung putih telur sebagai inhibitor protease, tetapi aktivitas penghambatannya kurang efektif dibandingkan plasma. Hal ini dikarenakan tepung putih telur lebih efektif dalam menghambat protease serin, sedangkan katepsin L yang menyebabkan pelunakan gel merupakan protease sistein (Fowler dan Park 2015a). Selain itu, plasma mengandung inhibitor protease, yaitu alfa-2 makroglobulin (Barret 1981), yang diketahui dapat menghambat sistein protease. Alfa-2 makroglobulin adalah protease inhibitor nonspesifik yang tersedia secara luas dalam plasma ikan (Li *et al.* 2008b).

Ikan mujair (*Oreochromis mossambicus*) dijadikan bahan baku surimi diantaranya yaitu dagingnya yang putih, dari segi kesediaan ikannya dapat dibudidayakan. Murthy *et al.* (2011) mengungkapkan bahwa surimi ikan mujair menghasilkan kekuatan gel yang cukup baik (moderat) yaitu 5693,8 g.mm .

Penelitian ini menggunakan *crude* plasma dan fraksi plasma dari belut sawah sebagai inhibitor protease. Tujuan penelitian ini adalah untuk mencari alternatif sumber protease inhibitor dari ikan air tawar dan mengkaji kemampuan *crude* plasma dan fraksi etanol plasma dalam menghambat aktivitas enzim tripsin dan papain, serta dalam mempertahankan kualitas surimi ikan mujair (*Oreochromis mossambicus*) dari aktivitas protease yang menyebabkan modori atau pelunakan gel.

## 1.2 Rumusan Masalah

Pelunakan gel (modori) merupakan suatu masalah yang dihadapi oleh industri surimi. Peristiwa ini disebabkan oleh enzim protease sistein yaitu katepsin L yang optimal bekerja pada suhu 55 °C. Enzim protease ini tidak dapat dihilangkan meskipun sudah dilakukan proses pencucian karena terikat kuat dengan protein miofibril yang merupakan komponen utama surimi setelah proses pencucian, sehingga menyebabkan terjadinya autolisis. Protein miofibril terdiri dari aktin dan miosin, dan miosin berperan penting pada pembentukan gel surimi.

Miosin merupakan protein utama yang dipengaruhi oleh aktivitas enzim proteolitik sehingga menyebabkan modori pada surimi yang merupakan dampak dari autolisis enzim.

Untuk mengatasi permasalahan tersebut industri surimi menggunakan penghambat aktivitas enzim protease (inhibitor protease). Salah satu sumber inhibitor protease yaitu plasma darah. Plasma darah mengandung inhibitor protease yaitu alfa-2-makroglobulin yang dapat menghambat aktivitas semua kelas protease. Pada awalnya digunakan plasma darah sapi, akan tetapi dihentikan penggunaannya karena adanya penyakit sapi gila. Akhirnya industri surimi menggunakan tepung putih telur (*dried egg white*) dan tepung kentang, akan tetapi kurang efektif karena tepung putih telur dan tepung kentang mengandung inhibitor protease serin, sedangkan katepsin L tergolong sistein protease. Beberapa inovasi dilakukan oleh beberapa peneliti untuk mencari alternatif, diantaranya pemanfaatan plasma ikan.

Belut merupakan komoditas perikanan air tawar yang memiliki nilai ekonomis yang tinggi. Jika dilihat dari volume darah yang dikandung, darah belut relatif lebih banyak dibandingkan spesies ikan yang lain (30-35 mL/Kg belut). Berdasarkan hasil penelitian Nopianti *et al.* (2019) *crude* plasma belut sawah (*Monopterus albus*) mampu menghambat aktivitas enzim papain dan tripsin lebih baik dibandingkan ikan patin. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian lanjutan ke tahap fraksinasi plasma belut sawah dengan etanol 40% pH 5,5 serta melihat pengaruhnya terhadap penghambatan autolisis pada surimi.

### 1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Mendapatkan fraksi plasma belut sawah yang kaya akan alfa-2 makroglobulin.
2. Mengukur aktivitas inhibitor fraksi plasma belut.
3. Mendapatkan profil berat molekul protein hasil fraksinasi plasma belut sawah.
4. Mengukur kemampuan fraksi dan *crude* plasma belut dalam menghambat autolisis surimi.

### 1.4 Manfaat

Adapun manfaat dari penelitian ini adalah memberikan informasi tentang potensi plasma darah belut sebagai inhibitor protease pada surimi.

### 1.5 Kebaruan (*novelty*)

1. Permurnian parsial *crude* plasma belut sawah berpotensi mendapatkan fraksi plasma sebagai inhibitor protease.
2. Plasma belut dan atau fraksinya sebagai sumber inhibitor protease jenis Katepsin L yang potensial untuk mempertahankan struktur surimi dari autolisis.
3. Profil protein inhibitor protease dan aplikasi fraksi inhibitor dalam mempertahankan struktur surimi.

## II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Belut

Belut merupakan ikan hermaphrodit protogini, dimana kelaminnya akan mengalami diferensiasi dari fase betina menjadi jantan ketika dewasa. Perubahan ini terjadi pada belut yang berumur sekitar 9 bulan. Di Indonesia umumnya terdapat tiga jenis belut berdasarkan habitat hidupnya, yaitu belut rawa, belut sawah, dan belut laut (Roy 2013). Komposisi kimia belut dapat dilihat pada Tabel 1. Negara dengan produksi belut tertinggi yaitu Cina (367,55 ribu ton), diikuti oleh negara Thailand (1,6 ribu ton), Kamboja (40 ton), dan Singapura (2,6 ton) pada tahun 2015. Hal ini mengartikan bahwa produksi belut di Cina sebanyak 99,56% dari total produksi dari keempat negara tersebut yaitu 369,18 ribu ton pada tahun 2015. Pada negara dominan produksi belut tersebut, produksi belut terus mengalami peningkatan. Pada tahun 2003 produksi belut hanya 108,68 ribu ton, dan meningkat menjadi 369,19 ribu ton di tahun 2015 (Tridge 2018).

Belut yang diproduksi di Indonesia kebanyakan diekspor ke Cina, Hongkong, Jepang, Singapura, Taiwan, Korea, dan Thailand. Produksi belut mencapai 2,2 ribu ton di tahun 2013 dan menjadi 2,7 ribu ton pada tahun 2014. Permintaan terhadap belut sebagai produk pangan yang tinggi nutrisinya meningkat setiap tahunnya, baik lokal maupun luar negeri. Pada akhir tahun 2015, jumlah permintaan luar negeri meningkat menjadi 4,8 ribu ton, peningkatan mencapai 77.2% dibanding tahun 2014 (Herawati *et al.* 2018).

Tabel .1 Komposisi kimia belut (*Monopterus albus*)

Komposisi kimia	Kandungan (%)
Kadar air	77,00±0,08
Crude protein ( <i>dry basis</i> )	79,00±0,20
Non-protein N ( <i>dry basis</i> )	1,90±0,64
Pure Protein N ( <i>dry basis</i> )	66,70±0,71
Lemak ( <i>dry basis</i> )	10,74±0,48
Kadar abu ( <i>dry basis</i> )	7,00±0,57

Sumber: Vishwanath *et al.* (1998)

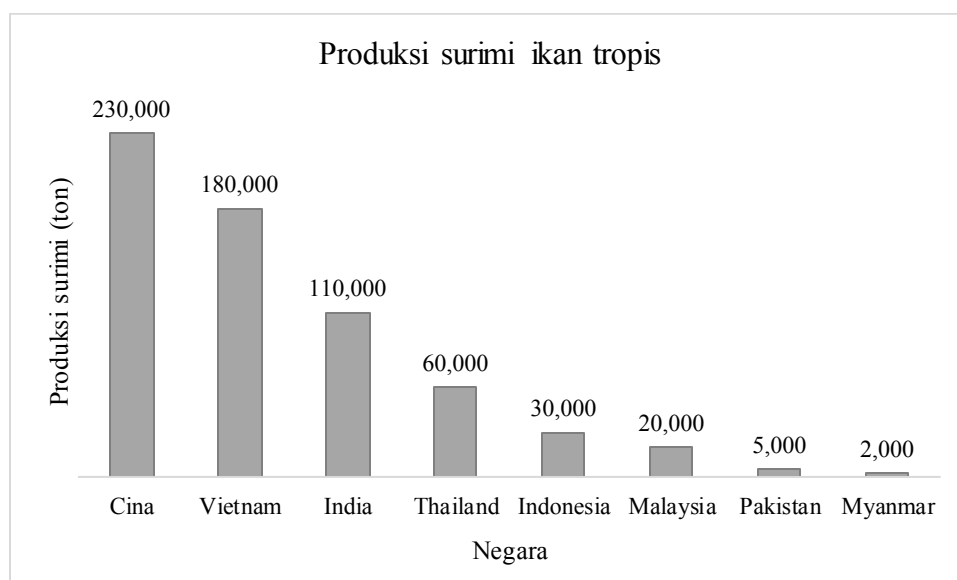
### 2.2 Surimi

Surimi adalah produk intermediat yang terbuat dari daging giling ikan yang telah mengalami proses pencucian, penyaringan, pengepresan dan pencampuran krioprotektan. Surimi dalam bentuk beku dikembangkan pada tahun 1960 yang bertujuan untuk memperluas jangkauan pemasaran, dengan bahan baku yang digunakan yaitu walleye Pollock dan Alaska Pollock. Di Asia Tenggara (Thailand, Malaysia, Indonesia, Vietnam, Myanmar), serta India, Pakistan dan Cina bahan baku yang digunakan oleh industri surimi berasal dari ikan tropis. Negara-negara ini menjadi produsen *seafood* terbesar di dunia dalam hal perikanan tangkap dan budidaya (Park 2020).

Kawasan Asia Pasifik merupakan penghasil ikan terbesar, mewakili lebih dari 50% produksi di dunia, dengan Cina menempati posisi pertama, kemudian diikuti oleh Indonesia. Selain tercatat sebagai negara penghasil perikanan tangkap, kawasan ASEAN juga menghasilkan ikan budidaya dari total produksi ikan yang

dihasilkan dan terus berkembang dari 17% pada tahun 2000 menjadi 35,5% di tahun 2014. Produksi surimi dari ikan hasil budidaya saat ini sama atau melebihi produksi dari perikanan tangkap.

Produksi surimi di Asia Tenggara memanfaatkan ikan demersal sebagai bahan baku. Ikan threadfin bream (*Nemipterus* spp.) dan goatfish (*Upeneus* spp.) merupakan ikan yang dominan tertangkap dari total penangkapan ikan di Asia Tenggara. Ikan jenis lain yang bersamaan didapatkan yaitu croacker (*Johnius* spp., *Pennahia* spp.), big-eye snappers (*Priacanthus* spp.) dan lizardfish (*Saurida* spp.). Produksi surimi pada negara Asia Tenggara, India, Pakistan dan Cina dapat dilihat pada Gambar 1. Penghasil surimi dengan bahan baku ikan tropis yaitu negara Cina, sedangkan untuk wilayah Asia Tenggara yaitu negara Vietnam. Produksi surimi Indonesia masih sangat rendah dibandingkan kedua negara tersebut walaupun penghasil ikan tangkap terbesar di dunia setelah Cina (Park 2020).



Gambar 1 Persentase produksi surimi di Asia (Park 2020)

Pengaruh enzim protease pada fillet dan gel surimi telah dipelajari pada ikan Pacific whiting. Enzim katepsin adalah enzim yang bertanggung jawab terhadap pelunakan pada pacific whiting. Pada fillet pacific whiting, katepsin B adalah enzim yang paling berperan terhadap pelunakan, sedangkan pada produk suriminya enzim katepsin L yang paling aktif. (An *et al.* 1994). Perbedaan ini disebabkan enzim katepsin B terikat dengan protein sarkoplasma, sedangkan katepsin L terikat dengan protein myofibril yang merupakan komponen utama surimi (Yongswatdigul *et al.* 2014). Karena perbedaan keterikatan tersebut, katepsin B sangat mudah terbuang pada saat tahap proses pencucian pembuatan surimi, sedangkan katepsin L terikat kuat dengan protein myofibril yang tidak terpengaruh dengan proses pencucian (Fowler 2014).

Katepsin L umumnya aktif pada pH saat post mortem, sedangkan kelas protease lain pada spesies ikan perairan hangat (tropis) aktif pada pH alkali (Wasson 1993). Serin yang merupakan tipe protease alkali yang menyebabkan kerusakan miosin pada surimi tilapia ketika diinkubasi pada suhu 65°C (Yongsawatdigul *et al.* 2000). Surimi dari ikan lizardfish juga mengalami

penurunan kekuatan gel ketika diinkubasi pada suhu 65°C yang disebabkan oleh protease serin (Yongsawatdigul dan Piyadhamviboon 2004). Protease alkali juga menyebabkan menurunnya kualitas surimi yang terbuat dari ikan carp (Cao *et al.* 2004) dan bigeye snapper (Benjakul *et al.* 2003).

Pada industri surimi, inhibitor protease serin dan sistein sangat penting. Plasma darah telah diketahui mengandung berbagai macam inhibitor protease seperti kininogen yang merupakan inhibitor protease sistein dan alfa-2 makroglobulin (Seymour *et al.* 1997). Alfa-2 makroglobulin memiliki daya tarik tersendiri karena kemampuannya dapat menghambat protease dari semua kelas. Alfa-2 makroglobulin bekerja dengan cara yang unik yaitu “*trapping mechanism*”. Protease membelah daerah umpan dalam molekul, secara kovalen mengikatnya ke inhibitor. Karena alfa-2 makroglobulin merupakan molekul besar, enzim menjadi tidak mampu mencapai substratnya karena hambatan sterik. Karena fungsinya tersebut, alfa-2 makroglobulin memerlukan paling sedikit 2 subunit. Alfa-2 makroglobulin manusia memiliki 4 subunit (Enghild *et al.* 1989). Selain itu, alfa-2 makroglobulin juga dapat meningkatkan ikatan kovalen di surimi, sehingga meningkatkan kekuatan gel surimi (Seymour *et al.* 1997). Alfa-2 makroglobulin dapat berfungsi sebagai inhibitor protease dan dapat meningkatkan kekuatan gel. Plasma sapi digunakan sebagai bahan aditif di surimi, tetapi hal ini tidak lama diaplikasikan karena berjangkitnya penyakit sapi gila. Plasma darah dari sumber lain terus diteliti, diantaranya yaitu plasma darah babi yang mengandung inhibitor protease katepsin B dan katepsin L berupa kininogen dengan berat molekul 55 kDa (Lee *et al.* 2000), dan suatu fraksi dari plasma ayam juga mengandung inhibitor protease sistein (Rawdkuen *et al.* 2007). Selain dari hewan darat tersebut, protease sistein nonkompetitif diisolasi dari plasma ikan chum salmon (Li *et al.* 2008a).

Pada saat ini industri surimi menggunakan tepung putih telur sebagai inhibitor protease. Suatu studi yang membandingkan putih telur, plasma sapi, dan tepung kentang, ditemukan bahwa tepung putih telur memiliki aktivitas yang tinggi terhadap protease serin. Putih telur menurunkan aktivitas tripsin (protease serin) sebesar 99%. Plasma sapi memiliki aktivitas penghambatan yang tinggi terhadap protease sistein, sedangkan tepung putih telur dan tepung kentang lebih menghambat protease serin daripada protease sistein (Weerasinghe *et al.* 1996).

### 2.3 Enzim Protease

Protease yang menghidrolis ikatan peptida protein terbagi menjadi dua subkelas berdasarkan sisi yang dipotong yaitu endopeptidase dan eksopeptidase. Endopeptidase memotong ikatan peptida di dalam rantai protein yang menghasilkan peptida dan polipeptida, sedangkan eksopeptidase menghidrolisis bagian ujung amino atau karboksil dari suatu ikatan peptida sehingga menghasilkan satu asam amino dan sisa peptida. Pemotongan ikatan peptida menyebabkan perubahan bentuk atau struktur dari protein, sehingga menghasilkan modifikasi pada sifat fisikokimia dan fungsionalnya. Protease juga bisa diklasifikasikan berdasarkan kesamaan dengan protease yang telah dikenal, seperti *trypsin-like*, *chymotrypsin like*, *chymosin-like*, atau *cathepsin-like* (Singh dan Benjakul 2018).

Selain itu, protease juga dikategorikan berdasarkan sensitifitas terhadap pH (protease asam, protease basa, protease netral), dan bahkan berdasarkan

spesifitasnya terhadap substrat, respon terhadap inhibitor, dan model katalisisnya. Berdasarkan mekanisme katalisisnya, lebih jauh lagi protease dapat dibedakan berdasarkan sisi aktifnya, seperti aspartik, sistein, serine dan metalloprotease yang dikemukakan oleh *Enzyme Commission of The International Union of Biochemist*. Protease pada ikan memiliki sifat molekuler yang beragam, bergantung pada spesies, organ, dan faktor lingkungan (Sriket, 2014).

Perubahan biokimia yang disebabkan oleh enzim endogen, termasuk protease, merupakan penyebab utama penurunan kualitas pada ikan dan *shellfish* selama penyimpanan walaupun dalam kondisi dingin. Bahkan enzim protease yang bertanggung jawab terhadap terjadinya “gaping” dan “mushiness” pada bony fish dan pelunakan pada lobster. Ikan dan *shellfish* setelah postmortem rentan terhadap serangan enzim protease endogen yang menyebabkan pelunakan pada daging. Pada Tabel 2 dapat dilihat enzim protease yang terdapat di daging dan saluran pencernaan ikan dan *shellfish* yang diasosiasikan sebagai penyebab pelunakan dagingnya.

Tabel 2 Protease endogen yang terlibat pada pelunakan daging ikan dan *shellfish*

Spesies ikan	Penurunan kualitas	Enzim yang terlibat	Referensi
Protease daging			
Tilapia ( <i>Oreochromis niloticus</i> )	Pelunakan daging	Serin dan metalloprotease	Ishida et al. (2003)
Cod spotted wolfish and Atlantic salmon	Pelunakan fillet dan <i>gaping</i> pada daging	Metalloprotease	Lødemel et al. (2004)
Silver carp ( <i>Hypophthalmichthys molitrix</i> )	Degradasi pada daging	Protease serine yang terikat di miofibril	Cao et al. (2004)
Atlantic salmon ( <i>Salmo salar</i> )	Pelunakan fillet	Katepsin dan collagenase-like enzyme	Hultmann and Rustad (2004)
Dark muscle dari ikan mas ( <i>Cyprinus carpio</i> )	Pelunakan daging	Metalloprotease	Wu et al. (2008)
Bream ( <i>Pagrus major</i> )	Pelunakan daging, degradasi kolagen	Protease serine kolagenolitik	Wu et al. (2010)
Protease saluran pencernaan			
White shrimp ( <i>Penaeus vannamei</i> )	Tekstur daging lembek	Enzim kolagenolitik	Brauer et al. (2003)
Shrimp ( <i>Penaeus orientalis</i> )	Tekstur daging lembek	Tripsin dan Collagenase-like enzyme dari hepatopankreas	Oh et al. (2000)
Herring	Perut pecah	Enzim serin kolagenolitik berasal dari pyloric caeca	Felberg et al. (2010)

Udang air tawar ( <i>Macrobrachium rosenbergii</i> )	Pelunakan daging	yang bocor Tripsin like collagen dari hepatopankreas	Sriket <i>et al.</i> (2012)
---	------------------	---	--------------------------------

### 2.3.1 Protease Serin

Protease serin atau alkali adalah protease yang memiliki serin “super reactive” pada sisi aktifnya (Simpson 2000). Berdasarkan struktur homologi protease serin dapat dikelompokkan menjadi tripsin dan subtilisin. Keluarga tripsin adalah enzim yang paling banyak ditemukan di mamalia dan bakteri. Beberapa contoh yang umum enzim yang berada di saluran pencernaan seperti tripsin, kimotripsin, dan elastase, serta enzim pembekuan darah seperti thrombin, plasmin. Sedangkan keluarga subtilin hanya terdapat di bakteri (Hamilton *et al.* 2003).

Aktivitas tripsin bergantung pada spesies ikan dan nilai pH, dimana kondisi pH netral atau pH yang lebih tinggi optimal untuk aktivitas hidrolitik (Hultmann dan Rustad 2004). Protease serin secara umum aktif pada pH netral dan basa, dengan optimal pH 7-11. Berat molekulnya yaitu 18-35 kDa (Rao *et al.* 1998; Klomklao 2008). Titik isoelektrik protease umumnya pada rentang pH 4-6. Tripsin (EC 3.4.21.4) merupakan anggota keluarga besar dari protease serin, secara spesifik menghidrolisis protein dan peptida di sisi karboksil dari residu arginin dan lisin (Klomklao *et al.* 2006). Tripsin berperan penting pada proses biologi, diantaranya pencernaan, aktivasi zymogen kimotripsin dan enzim-enzim lain (Cao *et al.* 2000). Tripsin pada ikan menyerupai tripsin mamalia jika dilihat dari berat molekul (22-30 kDa), komposisi asam amino dan sensitifitasnya terhadap inhibitor. Suhu optimal untuk hidrolisis berkisar antara 35-65°C (Nalinanon *et al.* 2008; Ahmad *et al.* 2011).

### 2.3.2 Protease Sistein

Protease sistein lisosom, umumnya dikenal sebagai katepsin, berperan penting dalam banyak proses fisiologis seperti degradasi protein (Turk *et al.* 2000). Katepsin aktif pada kondisi pH asam lemah (pH 5). Diantara enzim lisosom, katepsin B, C, H, L, S telah dipurifikasi dan dikarakterisasi dari daging ikan dan *shellfish*, dan merupakan protease utama penyebab kerusakan protein intrasellular (Aoki *et al.* 2004; Pangkey *et al.* 2000). Membran lisosom dapat kehilangan integritasnya disaat kondisi postmortem, sehingga menyebabkan terlepasnya enzim katepsin ke sarkoplasma (Balti *et al.* 2010). Meskipun katepsin daging umumnya aktif pada pH 3-4, beberapa dari enzim tersebut mempertahankan aktivitasnya yang cukup tinggi hingga pH 7.0 (Kolodziejska dan Sikorski 1997; Balti *et al.* 2010). Bahuaud *et al.* (2010) mengungkapkan bahwa katepsin B dan L yang bertanggung jawab terhadap pelunakan daging ikan Atlantik salmon (*Salmo salar* L.). Katepsin L aktif pada suhu tinggi.

Katepsin L adalah proteinase dominan yang bertanggung jawab untuk autolisis daging ikan arrowtooth flounder pada suhu tinggi (Visessanguan *et al.* 2001). Katepsin L termasuk ke dalam keluarga papain yang merupakan protease sistein (Bühling *et al.* 2002). Whang *et al.* (2011) melaporkan katepsin ikan rock beam mengandung 336 residu asam amino dengan berat molekul 38 kDa. Berdasarkan hasil sekuensing, katepsin L memiliki karakteristik khas keluarga papain protease sistein dan sisi aktif untuk protease tiol/sulfidril eukariotik sistein



terdapat residu sistein, histidin dan asparagine. Selain menghidrolisis protein myofibril, katepsin L dilaporkan memiliki aktivitas tinggi melawan berbagai kolagen. Oleh karena itu, katepsin L diduga menyebabkan disintegrasi parsial struktur matriks ekstraseluler asli, sehingga terjadi pelunakan pada jaringan ikan dan *shellfish* (Sriket 2014).

Pada fillet ikan Pacific whiting, katepsin B merupakan enzim yang paling aktif bekerja, sebaliknya pada surimi yang paling aktif adalah katepsin L (An *et al.* 1994). Perbedaan ini dikarenakan katepsin B terikat dengan protein sarkoplasma, sedangkan katepsin L terikat dengan protein myofibril (Yongswatdigul *et al.* 2014). Perbedaan keterikatan menyebabkan katepsin B mudah terbuang pada saat tahap proses pencucian pembuatan surimi, sedangkan katepsin L yang terikat kuat dengan protein miofibril yang tidak terpengaruh oleh proses pencucian.

### 2.3.3 Protease Aspartik

Protease aspartik umumnya dikenal sebagai protease asam, bergantung pada residu asam aspartik untuk aktivitas katalitik. Protease aspartik kebanyakan terdapat pada keluarga pepsin. Keluarga pepsin termasuk enzim pencernaan seperti pepsin, kimosin serta katepsin D lisosom dan enzim pengolahan seperti renin dan protease jamur tertentu (penicillopepsin, rhizopuspepsin, endothiapepsin) (Hughes *et al.* 2003). Enzim-enzim ini aktif pada pH asam dengan kisaran 2-4. Katepsin D menunjukkan beberapa aktivitas dalam rentang pH terendah yang berlaku pada beberapa ikan setelah postmortem. Namun masih belum diketahui secara pasti apakah katepsin D sebagai penyebab pelunakan ikan yang disimpan pada suhu dingin (Sriket 2014).

### 2.3.4 Metalloprotease

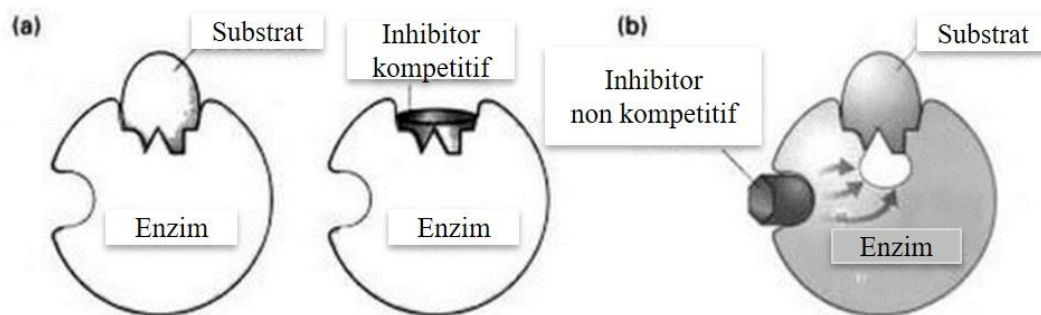
Metalloprotease berasal dari berbagai sumber, seperti kolagenase dari organisme tingkat tinggi, racun ular, dan termolisin dari bakteri. Metalloprotease mengandung atom seng yang secara katalitik aktif (Sriket 2014). Metalloprotease matriks (MMPs) adalah keluarga endopeptidase yang bertanggung jawab terhadap degradasi kolagen dalam cairan ekstraseluler (Carmeli *et al.* 2004). Banyak metalloprotease mengandung urutan asam amino His-Glu-Xaa-Xaa-His (HGXXH), yang menyediakan dua ligan histidin untuk seng, sedangkan ligan ketiga adalah asam glutamate (termolisin, neprilisin, alanil aminopeptidase) (Dauch *et al.* 1995; Kadonosono *et al.* 2007). Mekanisme katalitik mengarah pada pembentukan intermediet tetrahedral non-kovalen setelah serangan ikatan seng dengan molekul air pada gugus karbonil dari ikatan scissile (Skiles *et al.* 2004). Selanjutnya intermediet tetrahedral non-kovalen diuraikan dengan mentransfer proton asam glutamate ke gugus yang dilepas (Sriket 2014).

## 2.4 Penggolongan Inhibitor Enzim

Kerja enzim dapat dihambat dengan keberadaan molekul lain yang dapat menurunkan aktivitasnya. Berdasarkan kestabilan penghambatan, sifat penghambatan dapat dibagi dua jenis, yaitu penghambatan reversible (tidak stabil) dan penghambatan irreversible (stabil). Penghambatan irreversible terjadi dimana reaksi kimianya berjalan searah, inhibitor membentuk ikatan kovalen dengan sisi aktif enzim dan sangat sulit untuk dipisahkan lagi. Sedangkan penghambatan reversible yang terjadi justru sebaliknya, dimana aktivitas penghambatan berjalan

dua arah atau bolak balik, ikatan antara inhibitor dan enzim tidak kuat sehingga mudah untuk dipisahkan lagi. Inhibitor reversible dibagi lagi menjadi dua, yaitu inhibitor kompetitif dan inhibitor non-kompetitif. Inhibitor kompetitif merupakan suatu molekul yang berkompetisi dengan substrat untuk berikatan dengan sisi aktif enzim.

Enzim mengenali inhibitor sebagai substrat dan mengikatnya, tetapi tidak dapat mengubahnya menjadi produk. Inhibitor kompetitif secara kimia sangat menyerupai molekul substrat. Inhibitor non-kompetitif tidak berikatan dengan sisi aktif enzim, akan tetapi berikatan dengan sisi lain enzim dan mengubah struktur sisi aktif enzim. Inhibitor non-kompetitif kebanyakan berupa ion logam berat (Clugston dan Flemming, 2000). Mekanisme kerja dari inhibitor kompetitif dan inhibitor non kompetitif dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2 Mekanisme penghambatan: a). Inhibitor kompetitif, b). Inhibitor non-kompetitif (Clugston dan Flemming 2000)

## 2.5 Plasma Darah Sebagai Inhibitor Protease

Secara umum darah terkandung sebanyak 7% dari total berat tubuh mamalia, dan dari proses pematangan hewan dapat diambil sekitar 3-4%. Darah dimanfaatkan sebagai ingredient pada produk berbahan baku daging, seperti sosis, puding, dan sebagainya. Darah sapi dan babi telah digunakan sebagai bahan dasar untuk produksi sejumlah besar fungsional ingredient (Phillips dan William 2011). Adapun komposisi dari darah dan fraksi yang dominan dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3 Komposisi fraksi dari darah

Fraksi Darah	Protein (%)	Kadar Air (%)
<i>Whole blood</i>	17-18	75-82
Plasma	6-8	90-92
<i>Cells</i>	34-38	60-62
<i>Dried plasma</i>	70-95	5-10

Sumber: Phillips dan Williams (2011)

Untuk menghasikan ingredient yang berasal dari darah yang memiliki nilai fungsional, pertama-tama darah dipisahkan menjadi dua fraksi, yaitu plasma (60-80%) dan sel-sel darah (20-40%). Pemisahan dilakukan dengan cara sentrifugasi selama 20 menit dan harus dilakukan segera mungkin setelah proses pematangan atau penyembelihan serta harus dilakukan secara berhati-hati untuk menghindari terjadinya hemolisis sel darah merah sehingga akan sulit untuk memisahkan plasma. Penggunaan antikoagulan seperti asam sitrat atau sodium sitrat juga

dilakukan untuk mencegah koagulasi darah. Setelah proses pemisahan, fraksi plasma dibekukan, dikonsentrasikan dan *spray-dried* sebelum digunakan (Phillips dan William 2011).

Plasma darah secara luas telah dimanfaatkan di negara Eropa sebagai ingredient untuk pengolahan sosis. Plasma darah mengandung protein yang berkontribusi pada sifat dan struktur gel. Protein plasma darah yang banyak jumlahnya yaitu albumin, immunoglobulin, dan fibrinogen (Tabel 4). Penggunaan plasma pada pembuatan sosis menguntungkan karena tingginya nilai *water holding capacity* (WHC) dan kemampuan pembentukan gel dari protein plasma. Fungsi dasar plasma darah sebagai ingredient pada produk daging adalah meningkatkan kekuatan gel yang diinduksi oleh perlakuan panas. Fungsi dari plasma adalah menahan air dan lemak sehingga terbentuk formasi matriks. Kemampuan pembentukan gel oleh protein plasma ditentukan oleh kekakuan gel, elastisitas, viskositas, suhu dan waktu pemanasan, konsentrasi protein, pH dan kekuatan ion (Zayas 1997).

Tabel 4 Protein dalam plasma

Protein	Konsentrasi (%)
<b>Albumin:</b>	<b>42</b>
- Prealbumin	0,3
- Albumin	41
<b>Globulin:</b>	<b>56</b>
- $\alpha$ -globulin	14
- $\beta$ -globulin	11
- $\gamma$ -globulin	31
<b>Fibrinogen</b>	<b>2</b>

Sumber: Moure *et al.* (2004)

Fungsi penting lain dari plasma darah adalah sebagai inhibitor protease. Beberapa penelitian yang memanfaatkan plasma darah sebagai inhibitor protease diantaranya yaitu plasma darah ikan chum salmon (*Onchorhynchus keta*) (Li *et al.* 2008a), plasma darah babi (Benjakul dan Visessanguan 2000; Benjakul *et al.* 2001), plasma darah ayam (Rawdkuen *et al.* 2007), plasma darah sapi (Kang dan Lanier 1999; Marquez-Alvarez *et al.* 2015), plasma darah grouper (Chuang *et al.* 2008, 2013), plasma darah cobia (*Rachycentron canadum*) (Chuang *et al.* 2014) dan plasma darah salmon (Fowler dan Park 2015a). Pemanfaatan plasma darah sapi dan ayam dibatasi karena adanya wabah penyakit sapi gila dan flu ayam (Li *et al.* 2008a). Plasma darah ikan merupakan salah satu alternatif bahan baku yang aman. Hasil penelitian mengenai pemanfaatan plasma darah ikan sebagai inhibitor protease dapat dilihat pada Tabel 5.

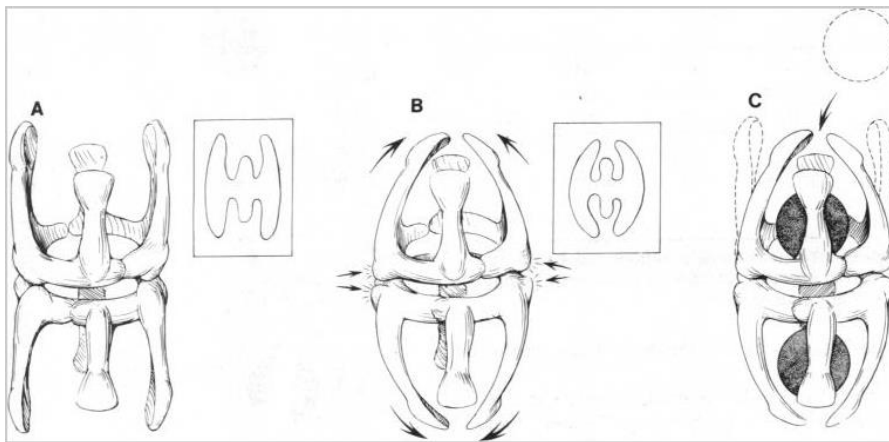
Tabel 5 Pemanfaatan plasma darah ikan sebagai inhibitor protease

Sumber Inhibitor Protease	Protease yang Dihambat	Referensi
Chum salmon ( <i>Oncorhynchus keta</i> )	Sistein	Li <i>et al.</i> (2008a)
Rainbow trout ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	Sistein dan serin	Li <i>et al.</i> (2008b)
Chinook salmon	Sistein	Fowler dan Park (2015)

## 2.6 Alfa-2 Makroglobulin

Alfa-2 makroglobulin ( $\alpha_2$ -M) adalah molekul besar glikoprotein dan memiliki aktivitas penghambatan terhadap protease pada spektrum yang luas pada vertebrata dan beberapa invertebrata (Chuang *et al.* 2014). Ikan memiliki mekanisme pertahanan non spesifik dan spesifik baik pada sistem humoral maupun seluler untuk melawan serangan asing (Ellis 1999). Keluarga  $\alpha_2$ -M terdiri atas  $\alpha_1$ - makroglobulin ( $\alpha_1$ -M),  $\alpha_2$ -makroglobulin, komponen komplemen (C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>), dan protein zona kehamilan (PZP) (Rehman *et al.* 2012). Alfa - 1-antiprotease dan  $\alpha_2$ - M merupakan dua inhibitor protease non spesifik utama pada ikan (Ellis 1999). Berat molekul  $\alpha_2$ -M pada ikan berkisar 360-380 kDa, dan berat molekul tersebut nilainya setengah dari berat molekul vertebrata tingkat tinggi. Prekursor (subunit)  $\alpha_2$ -M disintesis sebagai glikoprotein dengan berat molekul kurang lebih 180 kDa (Amstrong dan Quigley 1999).

$\alpha_2$ -M terdiri atas subunit yang identik, dapat dalam bentuk monomer, dimer atau tetramer (Rehman *et al.* 2013). Struktur tetramer dari empat subunit dan dua pasang jembatan disulfida adalah bentuk khas  $\alpha_2$ -M yang ditemukan pada kebanyakan plasma dari mammalia, burung, reptil dan amfibi, sedangkan pada ikan dan invertebrata umumnya dimmer (Starkey dan Barrett 1982a; Gollas-Galván *et al.* 2003). Keberadaan bentuk dimmer dari  $\alpha_2$ -Ms pada plasma ikan telah dipelajari sebelumnya pada spesies ikan sebelah (Starkey dan Barrett 1982b), rainbow trout (Ellis 1987), brook trout (Freedman 1991), common carp (Mutsuro 2000), groupers (Chuang *et al.* 2008, 2013), cobia (Chuang *et al.* 2014) dan salmon (Fowler dan Park 2015).



Gambar 3 Model  $\alpha_2$ -M. A. Native  $\alpha_2$ -M; B. Perubahan konformasi dari  $\alpha_2$ -M (panah kecil di tengah mengindikasikan posisi receptor-recognize sites); C. Protease yang terperangkap oleh  $\alpha_2$ - M (Feldman *et al.* 1985)

$\alpha_2$ - M adalah inhibitor protease yang jumlahnya banyak di plasma darah hewan (Starkey dan Barret 1982a). Pengikatan protease oleh  $\alpha_2$  M diinisiasi oleh serangan proteolitik enzim pada tempat tertentu (wilayah umpan) dari rantai polipeptida  $\alpha_2$ -M. Ketika ikatan petida di daerah umpan dari  $\alpha_2$ -M diserang oleh protease patogen, struktur  $\alpha_2$ -M berubah bentuk dan kemudian menjebak protease ke dalam suatu tempat yang telah dibuat oleh  $\alpha_2$ -M. Protease kemudian terperangkap dan terhalang secara sterikal karena bereaksi dengan molekul yang

lebih besar, dan kemudian aktivitas proteasenya benar-benar terhambat. Namun aktivitas enzim protease yang terperangkap tidak hilang ketika diuji menggunakan substrat dengan berat molekul kecil (Chuang *et al.* 2014). Mekanisme kerja  $\alpha 2$ -M dapat dilihat pada Gambar 3. Mekanisme perangkap dari inhibitor protease dipengaruhi oleh gerakan dua lengan jebakan persetengah molekul  $\alpha 2$ -M (Gambar 4).



Gambar 4 Separuh molekul dari  $\alpha 2$ -M (Feldman *et al.* 1985)

Terdapat lima sisi reaktif dari  $\alpha 2$ -M, diantaranya yaitu:

a. Daerah Umpan (*The Bait Region*)

Posisi di tengah dari masing-masing subunit menyajikan sekuens 25 asam amino yang terbuka dan sangat rentan terhadap pemotongan oleh endopeptidase yang berasal dari dirinya sendiri ataupun bukan. Pada pemotongan daerah umpan oleh protease, ester tiol internal terpapar, pemotongan tersebut menghasilkan perubahan konformasi struktur  $\alpha 2$ -M dan pemerangkapan protease. Pemerangkapan protease tidak memblok sisi aktif enzim, tetapi hanya menghalanginya untuk akses ke substrat besar (Rehman *et al.* 2012).

b. Ester Tiol Internal (*The Internal Thiol Ester*)

Ester tiol terbentuk antara sistein dan glutamin, yang labil dan mudah terpotong oleh panas (Doan dan Gettins 2008), nukleofil kecil, termasuk amina primer, reduktan dan air. Pemotongan ester tiol internal menghasilkan formasi  $\alpha 2$ -M baru dengan residu glutamil dan sisteinil yang reaktif pada masing-masing subunitnya. Residu glutamil dapat membentuk ikatan kovalen dengan lisin dari protease dan residu sisteinil mengikat cytokine (Athipposhy *et al.* 2011).

c. *The Receptor-binding Site*

Pada bagian ini mengandung 138 sekuens asam amino pada C-terminal dari masing-masing subunit  $\alpha 2$ -M. *The Receptor-binding Site* terekspos hanya setelah terjadi perubahan konformasi pada struktur  $\alpha 2$ -M, tidak pada native  $\alpha 2$ -M. Sisi pengikatan dikenali sebagai reseptor  $\alpha 2$ -M 600 kDa yang merupakan sel permukaan glikoprotein (Strickland *et al.* 1990; Wyaat dan Wilson 2012), superfamily low-density lipoprotein (LDL) (Pires *et al.* 2012; Wild *et al.* 2012).

d. *The Transglutaminase Reactive Site*

Sisi reaktif transglutaminase berada dekat daerah umpan, 20 asam amino upstream dari sisi pemotongan protease utama yang dapat diakses di  $\alpha 2$ -M asli

(Rehman *et al.* 2012).

e. Metalloprotein

$\alpha$ 2-M adalah metalloprotein dan merupakan protein plasma utama yang mengikat seng. Seng tidak dibutuhkan untuk pengikatan protease, tetapi dibutuhkan untuk pengikatan interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (Rehman *et al.* 2012).

## 2.7 Fraksinasi Plasma Darah

Untuk melaksanakan pemisahan dan purifikasi protein darah, hal yang penting yaitu memisahkan plasma dari fraksi selular. Plasma protein memiliki banyak manfaat fungsional dan dapat disediakan dalam bentuk fraksi kasar maupun murni. Ketika melakukan fraksinasi, karakteristik yang dilihat yaitu rendemen dan sifat fungsional yang dihasilkan maksimal. Sejumlah metode fraksinasi plasma dapat diklasifikasikan menjadi beberapa cara, diantaranya yaitu:

a. Fraksinasi berdasarkan perbedaan kelarutan protein; dimana pengendapan menurunkan daya tarik antara permukaan protein dan pelarut, menghasilkan interaksi protein-protein yang meningkat dan akhirnya terjadi pengendapan. Contohnya: fraksinasi dengan alkohol (Cohn *et al.* 1946), fraksinasi dengan polyethylene glycol (PEG) (Lee *et al.* 1987), salting-out (Parés *et al.* 2014).

b. Fraksinasi berdasarkan perbedaan interaksi dengan media padat atau metode kromatografi (Ramos-Clamont *et al.* 2003; Moure *et al.* 2003).

c. Fraksinasi berdasarkan perbedaan interaksi dengan parameter fisik seperti panas atau filtrasi membran (Del Hoyo *et al.* 2007; Del Hoyo *et al.* 2008).

Fraksinasi dengan etanol merupakan metode yang paling prinsipal untuk fraksinasi albumin pada penggunaan bidang farmasi. Metodenya berdasarkan prinsip perbedaan kelarutan protein plasma terhadap etanol yang telah dilarutkan dengan air destilasi (Cohn *et al.* 1946). Pelarut organik berinteraksi dengan grup protein polar, menggantikan air pada permukaan protein. Hal ini menyebabkan agregasi protein dan menurunkan kelarutan sehingga mengarah ke pengendapan protein. Parameter utama yang harus dikendalikan pada saat pengendapan plasma yaitu pH, kekuatan ion, suhu, dan konsentrasi protein. Fraksi-fraksi yang didapatkan yaitu: fibrinogen (8% etanol, pH 7.2);  $\gamma$ -globulin (19% etanol, pH 5.5);  $\alpha$ ,  $\beta$ - globulin (40% etanol, pH 5.5); albumin (40% etanol, pH 4.5). Setelah proses ekstraksi, endapan protein dengan mudah dilarutkan menggunakan buffer posfat pH 7.2 untuk memberikan volume yang setara dengan plasma asli yang digunakan (Álvarez *et al.* 2009) atau menggunakan buffer Tris-HCl 20 mM pH 7.5 (Moure *et al.* 2003).

Keuntungan fraksinasi dengan etanol yaitu aman, murah (dapat digunakan ulang), dan dapat diaplikasikan untuk skala besar, sedangkan kerugiannya yaitu suhu harus dikontrol, adanya protein yang hilang, dan penanganan pelarut harus hati-hati karena mudah terbakar (Denizli 2011). Fraksinasi menggunakan etanol, pengendapan protein maksimal akan didapatkan, menghasilkan fraksi-fraksi yang kaya protein dan protein yang bebas dari supernatant yang mengandung alkohol dapat dipulihkan (recovered) dengan destilasi serta digunakan kembali. Fraksinasi dengan etanol dapat digabungkan dengan kromatografi untuk menghasilkan fraksi yang lebih murni (Moure *et al.* 2003).

### III METODE

#### 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Juni 2019 hingga Oktober 2021 di Laboratorium Biokimia Pangan dan Pengolahan Pangan Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pangan, Institut Pertanian Bogor.

#### 3.2 Alat dan Bahan

Belut sawah dengan ukuran 10-15/kg diperoleh dari daerah Karawang, Jawa Barat. Papain, tripsin,  $N_{\alpha}$ -benzoyl-DL-arginine- $\beta$ -naphthylamide (BANA),  $N_{\alpha}$ -Benzoyl-L-arginine 4-nitroanilide hydrochloride (BAPNA), 2-mercaptoethanol,  $p$ -dimethylamino-cinnamaldehyde, sodium dodecyl sulfate dibeli dari Sigma Aldrich (USA). Urea dan Triton X-100 diperoleh dari Merck-Millipore (USA), sedangkan Trichloroacetic acid dibeli dari Merck-Supelco (Germany). Standar protein dengan berat molekul 11-245 kDa diperoleh dari Thermo Fisher Scientific (USA).

#### 3.3 Prosedur Kerja

##### 3.3.1. Fraksinasi *Crude* Plasma Belut Sawah (*Monopterus albus*)

###### 3.3.1.1 Preparasi *Crude* Plasma dan Fraksi Plasma

Darah belut dikumpulkan dari belut sawah hidup dengan proses *bleeding*. Darah belut kemudian ditambahkan EDTA 10% (*Ethylenediaminetetraacetic acid*) untuk mencegah terjadinya penggumpalan. Darah belut disentrifugasi pada 3000 rpm (1811 x g) selama 25 menit untuk mendapatkan plasma. Plasma yang telah didapatkan kemudian disentrifugasi kembali pada 1811 x g selama 25 menit, selanjutnya disimpan pada suhu -20°C sebelum digunakan.

Fraksi plasma didapatkan dengan cara memfraksinasi *crude* plasma dengan etanol 40% pH 5,5 berdasarkan metode Cohn *et al.* (1946). *Crude* plasma dilarutkan dengan air destilasi pada perbandingan 1:1 untuk mendapatkan konsentrasi protein menjadi 30-35 mg/mL. Plasma kemudian dicampur dengan etanol dingin 40% pada rasio 1:2 (Denizli 2011). Proses pengendapan dilakukan selama 1,5 jam pada suhu  $\pm$  4°C, kemudian dilanjutkan dengan proses sentrifugasi pada 1811 x g selama 10 menit. Pelet yang didapatkan dikeringkan dengan gas nitrogen selama  $\pm$  30 menit atau sampai beratnya konstan. Pelet kering yang dihasilkan kemudian dilarutkan dengan 200  $\mu$ L dari 20 mM Tris-HCl pH 8,0. Fraksi plasma yang dihasilkan kemudian disimpan pada suhu -20°C hingga waktu digunakan. Semua proses sentrifugasi dilakukan pada suhu -4 °C.

###### 3.3.1.2 Analisis Proksimat

###### 3.3.1.2.1 Kadar protein

Analisis protein menggunakan dua metode, yaitu:

- a. Metode Bradford

Analisis kandungan protein pada *crude* dan fraksi plasma dilakukan dengan mengikuti metode Bradford (1976), dan digunakan sebagai standar Bovine Serum Albumin (1000, 800, 600, 400, 200, 100 ppm). Sampel diukur dengan menggunakan instrumen iMark™ Microplate Absorbance Reader (Bio-Rad, USA). Sebanyak 10 µL sampel dicampur dengan 250 µL reagen Bradford dan dibiarkan bereaksi pada suhu kamar. Absorbansi dibaca pada panjang gelombang 595 nm.

b. Metode Kjeldahl

Kadar protein belut sawah dan surimi diukur menggunakan metode Kjeldahl (AOAC 2000). Sampel dilakukan digesti/destruksi, destilasi dan titrasi dengan 0,02 N HCl. Kadar protein dihitung dengan menggunakan faktor konversi 6,25.

$$\text{Protein (\%)} = \frac{((ml\ HCl\ sampel - mL\ HCl\ blanko) \times N\ HCl \times 14,007) \times 100}{mg\ sampel} \times 6,25$$

3.3.1.2.2 Kadar Lemak

Lemak yang terkandung di belut sawah dan surimi diekstrak menggunakan pelarut organik non-polar dengan metode Soxhlet (AOAC 2000). Sampel sebanyak 2-3 g yang telah dibungkus kertas saring diletakkan ke dalam selongsong lemak (*thimble*). Sampel kemudian dimasukkan ke dalam soxhlet dan ditambahkan pelarut heksan untuk proses ekstraksi. Lemak hasil ekstraksi yang terdapat di labu lemak dipisahkan dari heksan, kemudian dikeringkan dalam oven hingga mencapai berat konstan. Kadar lemak dihitung mengikuti formulasi berikut:

$$\text{Lemak (\%)} = \frac{W3 - W2}{W1} \times 100$$

Keterangan:

W1 = bobot sampel (g)

W2 = bobot labu lemak kosong (g)

W3 = bobot labu lemak + lemak hasil ekstraksi (g)

3.3.1.2.3 Kadar Air

Kadar air yang terdapat di belut sawah dan surimi diukur dengan metode oven (gravimetri) (AOAC 2000). Sampel ditimbang sebanyak 5 g (Y) ke dalam cawan yang sebelumnya telah dikeringkan dalam oven pada suhu 105 °C. Sampel diletakkan dalam oven dengan suhu 105 °C hingga tercapai berat konstan. Sampel didinginkan di dalam desikator dan selanjutnya segera dilakukan penimbangan (Y). Kadar air dihitung dengan cara sebagai berikut:

$$\text{Kadar Air (\%)} = 100 - \left[ \frac{(X - Y)}{X} \times 100 \right]$$

3.3.1.2.4 Kadar Abu

Kadar abu ditentukan dengan metode gravimetri dan alat yang digunakan adalah tanur listrik (AOAC 2000). Belut sawah dan surimi ditimbang ke



dalam cawan porselen sebanyak 2 g. Sampel kemudian dimasukkan ke dalam tanur listrik dengan suhu 550 °C hingga didapatkan berat konstan. Sampel didinginkan dalam desikator, selanjutnya dilakukan proses penimbangan. Kadar abu dihitung mengikuti formulasi berikut:

$$Kadar\ Abu\ (\%) = \frac{W1 - W2}{W} \times 100$$

Keterangan:

W = bobot sampel sebelum diabukan (g)

W1 = bobot sampel + bobot cawan setelah diabukan (g)

W2 = bobot cawan kosong (g)

### 3.3.1.3 Analisis Penghambatan Enzim Papain

Pengukuran inhibisi papain dilakukan dengan mengikuti metode Abe *et al.* (1994). Empat volume plasma yang berbeda (25, 50, 75, 100 µL) dilarutkan dengan air destilasi hingga volumenya mencapai 1,1 mL. Sebanyak 0,2 mL buffer natrium fosfat 0,25 M (pH 6,0) yang mengandung 2,5 mM EDTA, 25 mM 2-mercaptoethanol, ditambahkan ke 0,1 mL papain (5 µg/mL) dalam buffer natrium fosfat (pH 7,0), dan kemudian dilanjutkan dengan penambahan 0,2 mL larutan inhibitor. Campuran dihomogenkan dengan vortex dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit. Setelah inkubasi pertama, untuk memulai reaksi, ditambahkan 0,2 mL 1 mM BANA ke dalam larutan kemudian dilanjutkan dengan inkubasi tahap kedua pada suhu 37°C selama 10 menit. Reaksi dihentikan dengan menggunakan 1 mL HCl 2% dalam etanol. Sebanyak 1 mL ρ-dimethylamino-cinnamaldehyde 0,06% ditambahkan hingga terbentuk warna. Pembacaan absorbansi pada 540 nm dan aktivitas penghambatan ditunjukkan sebagai persentase penurunan OD540 dibandingkan dengan control.

### 3.3.1.4 Analisis Penghambatan Enzim Tripsin

Pengukuran penghambatan terhadap enzim tripsin dilakukan dengan mengikuti metode Fowler dan Park (2015a). Empat volume plasma yang berbeda (25, 50, 75, 100 µL) diencerkan hingga volume mencapai 250 µL. Sebanyak 150 µL larutan inhibitor dicampur dengan 300 µL enzim tripsin (20 µg/mL) dan 150 µL air destilasi. Kemudian campuran dihomogenkan dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit. Sebanyak 750 µL 50 mM BAPNA dalam buffer Tris HCl (pH 8,2) yang mengandung 20 mM CaCl<sub>2</sub> dan dipanaskan terlebih dahulu hingga 37°C ditambahkan ke dalam larutan campuran. Campuran reaksi diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit kemudian dihentikan dengan menambahkan 150 µL asam asetat 30%. Absorbansi sampel dibaca pada panjang gelombang 410 nm. Aktivitas penghambatan dicerminkan sebagai persentase penurunan OD410 dibandingkan dengan kontrol.

### 3.3.1.5 Profil Protein Fraksi Plasma

Berat molekul ditentukan dengan SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) menurut Laemmli (1970). Analisis

menggunakan gel pemisah (*separating gel*) 12% dan gel pengumpul (*stacking gel*) 4%. Stok buffer sampel terdiri dari 0,5 M Tris HCl (pH 6,8), 26,3% gliserol, 1% bromophenol blue, 10% SDS, kemudian ditambahkan air destilasi hingga mencapai volume 10 mL. Sebanyak 5% 2-merkaptotanol dicampur dengan buffer sampel, campuran ini dibuat hanya ketika akan digunakan, yang kemudian digunakan dengan perbandingan 1:1 terhadap sampel. Sampel dipanaskan pada suhu 90°C selama 5 menit untuk mendenaturasi protein sampel. *Running buffer* terdiri dari 25 mM Tris, 192 mM glisin, dan 0,1% SDS. Jumlah protein sampel adalah 20 µg untuk setiap sumur. Setelah proses *running* sampel selesai, gel direndam dengan akuabides selama 5 menit, kemudian pewarnaan gel dilakukan menggunakan *coomassie blue* selama 30 menit. Tahap akhir *destaining* yaitu dengan membiarkan gel terendam dalam larutan *destaining* semalaman pada suhu ruang. Berat molekul protein ditentukan melalui perbandingan dengan standar protein (11-245 kDa).

#### 3.3.1.6 Analisis Zimogram *Crude* dan Fraksi Plasma

Analisis zimogram ditujukan untuk melihat keberadaan protease pada *crude* dan fraksi plasma belut sawah. Substrat yang digunakan yaitu kasein 0,75% dalam NaOH 1M. Sampel dihitung untuk mendapatkan konsentrasi protein 40-50 µg, pengenceran sampel menggunakan Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7,2. Jumlah protein sebanyak 40-50 µg merupakan jumlah protein dalam total volume sampel yang akan diinjek yaitu sebanyak 20 µL setelah dicampur dengan sampel buffer. Sampel dicampur dengan sampel buffer 2x dengan perbandingan 1:1, biarkan campuran pada suhu ruang selama 5-10 menit sebelum diinjek.

Elektroforesis gel yang terdiri dari *separating gel* 12% dan *stacking gel* 4% diinstal ke alat elektroforesis. Chamber elektroforesis diisi dengan *running buffer* 1x, kemudian injek sampel sebanyak 20 µL dan protein standar ke dalam masing-masing sumur gel. Run sampel pada tegangan 50 V selama 2 jam 30 menit atau sampai sampel mencapai dasar gel. Setelah proses *running* selesai, selanjutnya yaitu proses renaturasi. Gel dipindahkan ke dalam wadah yang kemudian direndam dengan Triton X-100 2,5% sebanyak 100 mL. Gel diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang sambil digoyang-goyang menggunakan shaker.

Proses selanjutnya yaitu gel development. Triton X-100 2,5% dibuang, kemudian gel dibilas menggunakan akuades. Gel kemudian direndam dengan 50-100 mL buffer fosfat pH 8 atau hingga terendam, inkubasi selama 15 menit pada suhu ruang sambil digoyang-goyang. Buffer fosfat dibuang, gel direndam kembali dengan buffer fosfat pH 8 dan selanjutnya diinkubasi semalaman (18 jam) pada suhu 37 °C.

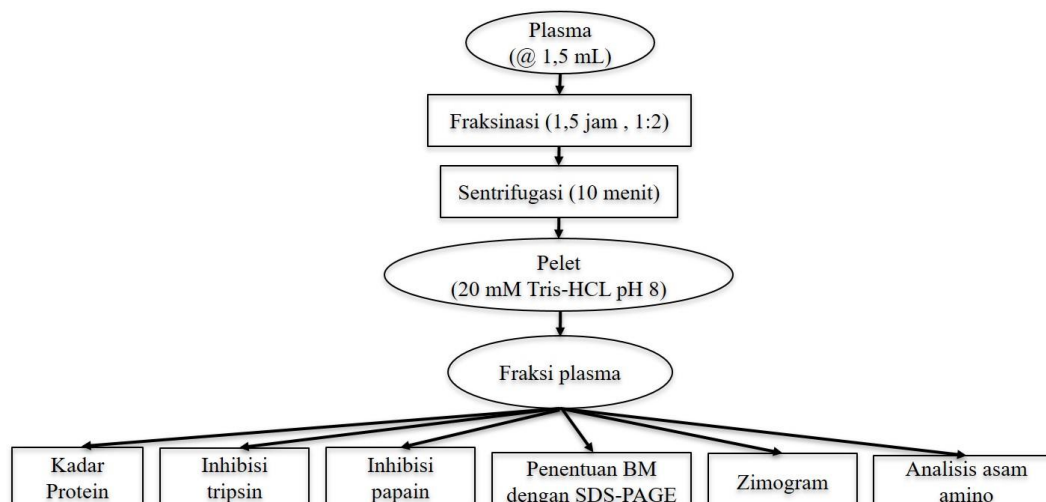
Tahap akhir yaitu proses *staining* dan *destaining* gel. Buffer fosfat pH 8 dibuang, kemudian gel diwarnai menggunakan *coomassie brilliant blue* (CBB) hingga terendam. Gel diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang dengan digoyang-goyang. Selanjutnya CBB dibuang, gel direndam dengan 20 mL *destaining* atau sampai gel terendam. Inkubasi gel pada suhu ruang dan sambil digoyang-goyang dengan *shaker*. *Destaining* diganti setiap 15-30

menit hingga pita bening jelas terlihat. Pita bening yang terlihat kemudian dibandingkan dengan standar protein untuk ditentukan berat molekulnya.

### 3.3.1.7 Analisis Asam Amino *Crude* dan Fraksi Plasma Belut Sawah (Ahmad 2015)

Asam amino ditentukan dengan menggunakan alat HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Pereaksi pra kolom yang digunakan yaitu ortoftalaldehida (OPA). Pereaksi OPA bereaksi dengan asam amino primer dalam suasana basa yang mengandung merkaptotanol membentuk senyawa yang berfluoresensi, sehingga deteksinya dapat dilakukan dengan detektor fluoresensi. Fase bergerak yang digunakan terdiri dari jenis, yaitu bufer A yang tersusun oleh Na-asetat, Na-EDTA, metanol, tetrahydrofuran, dan bufer B yang terdiri dari campuran metanol 95% dan air akuabides. Kolom yang digunakan yaitu Thermo Scientific ODS-2 Hyersil, laju aliran fase bergerak 1 mL/menit, dan detektor yang digunakan yaitu fluoresensi. Hasil HPLC diperoleh dalam bentuk signal kromatogram. Banyaknya jenis asam amino di lihat dari banyaknya puncak yang dihasilkan dibandingkan dengan standar. Persen masing-masing asam amino dalam sampel dapat dihitung sebagai berikut:

$$\text{Asam amino (AA) (\%)} = \frac{\mu\text{mol AA} \times \text{Mr. AA} \times 100}{\mu\text{g sampel}}$$



Gambar 5 Alur Proses Penelitian Tahap I

### 3.3.2. Aplikasi Plasma Belut Sawah (*Monopterus albus*) dalam Menghambat Autolisis Surimi Ikan Mujair (*Oreochromis mossambicus*)

#### 3.3.2.1 Preparasi Modori Gel Surimi Ikan Mujair (*Oreochromis mossambicus*)

Surimi terbuat dari ikan mujair (*Oreochromis mossambicus*), melalui tahap penyiangan, pemfilletan, penggilingan daging ikan, pencucian dan pengepresan. Surimi seberat 150 g dan garam sebanyak 2% (w/w) (Park 2000) dicampur menggunakan *chopper*. *Crude* plasma dan fraksinasi

plasma ditambahkan ke dalam surimi dengan konsentrasi akhir 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.50, dan 2.00 mg/g. Surimi dan inhibitor protease diaduk selama 5 menit. Pasta surimi kemudian dimasukkan ke dalam *polyvinylidene casing* dengan diameter 30 mm. Pasta surimi kemudian dipanaskan pada suhu 55°C selama 1 jam, selanjutnya dipanaskan pada suhu 90°C selama 20 menit, proses ini untuk menghasilkan modori gel. Setelah selesai proses pemanasan, surimi gel didinginkan dengan air es selama 30 menit dan disimpan satu malam pada suhu 4°C sebelum dianalisis.

### 3.3.2.2 Analisis Kekuatan Gel

Analisis tekstur gel surimi dilakukan dengan menggunakan TA-XT2i *Texture Analyzer*. Gel modori dikondisikan pada suhu kamar selama 2 jam, kemudian dipotong sepanjang 20 mm sebelum dianalisis. Kekuatan gel diukur dengan probe silindris (bulat), yang memiliki diameter 0,25 inci, jarak 11 mm, gaya 5 g, dan *load cell* 25 kg. Kekuatan gel dihitung mengikuti formulasi berikut (Park 2013):

$$\text{Kekuatan Gel (g.mm)} = \text{gaya (g)} \times \text{jarak (mm)}$$

### 3.3.2.3 Analisis *expressible moisture*

Pengukuran *expressible moisture* mengikuti metode Park (2013). Gel surimi dipotong dengan ketebalan 5 mm, ditimbang (X), kemudian ditempatkan di antara 2 lembar kertas Whatman nomor 1. Pemberat dengan berat 5 kg diletakkan di atas sampel selama 2 menit, kemudian modori gel ditimbang kembali (Y). *Expressible moisture* dihitung mengikuti formulasi berikut:

$$\text{Expressible moisture (\%)} = 100 \times ((X-Y)/X)$$

### 3.3.2.4 Analisis Uji Lipat

Analisis uji lipat mengikuti metode Park (2013). Gel modori dipotong setebal 2 mm, kemudian dievaluasi setelah dilakukan uji lipat dengan cara berikut:

- 5 tidak ada retak ketika gel modori dilipat 4
- 4 tidak ada retak ketika gel modori dilipat 2, retak ketika dilipat 4
- 3 tidak ada retak ketika gel modori dilipat 2, terbelah empat ketika dilipat 4
- 2 retak ketika dilipat 2
- 1 terbelah menjadi dua ketika dilipat 2

### 3.3.2.5 Analisis Kelarutan Protein

Kelarutan protein ditentukan mengikuti metode Robinson dan Hodgen (1940). Sampel gel surimi yang telah dihaluskan sebanyak satu gram dilarutkan dalam 10 mL 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) yang mengandung 1% SDS, 2%  $\beta$ -mercaptoethanol dan 8 M urea. Sampel dihomogenkan menggunakan homogenizer selama 1 menit, kemudian dipanaskan selama 2 menit, dan selanjutnya diaduk dengan magnetic stirrer selama 4 jam pada suhu ruang. Sampel kemudian disentrifuse pada 1811 x g selama 30 menit. Supernatan diambil sebanyak 10 mL, kemudian ditambahkan dengan 10 mL TCA 20% dingin. Sampel disimpan pada suhu 4°C selama 18 jam. Sampel

disentrifuse pada 1811 x g selama 20 menit dan endapan yang dihasilkan dibasuh dengan TCA 10% dan langsung dilarutkan dalam 0.5M NaOH. Konsentrasi protein diukur menggunakan metode Bradford (1976). Kelarutan protein diekspresikan sebagai persen dari total protein.

#### 3.3.2.6 Analisis Derajat Putih

Gel surimi berukuran diameter 30 mm dengan panjang 25 mm diukur derajat putihnya menggunakan Chromameter CR-400 (Minolta, Jepang). Nilai  $L^*$ ,  $a^*$ , dan  $b^*$  diukur. Pengaturan penggunaan alatnya yaitu illuminant D65, sudut pengamatan  $2^\circ$ , dan ukuran aperture 10 mm. Alat dikalibrasi menggunakan pelat standar berwarna putih sebelum pembacaan warna sampel. Derajat putih dihitung mengikuti formulasi di bawah ini (Park 2013):

$$\text{Derajat putih} = L^* - 3b^*$$

#### 3.3.2.7 Scanning electron microscopy (SEM)

Mikrostruktur gel modori dapat dilihat dengan menggunakan analisis SEM. Preparasi sampel analisis SEM mengikuti metode Nopianti *et al.* (2012). Gel modori dipotong dengan ukuran 0.5x0.5 cm. Sampel kemudian dibekukan menggunakan nitrogen cair dan disimpan pada suhu  $-20^\circ\text{C}$  sebelum dilakukan proses pengeringan beku selama 26 jam. Sampel yang telah kering kemudian dilakukan proses coating dengan emas, dan selanjutnya dilakukan analisis mikrostruktur gel modori menggunakan Scanning Electron Microscope JSM-IT200 (Jeol Ltd.) dengan perbesaran 1000x.

#### 3.3.2.8 Analisis Autolisis Surimi Ikan Mujair (*Oreochromis mossambicus*)

##### 3.3.2.8.1 Profil Protein Autolisis Surimi

Pengaruh crude plasma dan fraksi plasma dalam menghambat autolisis protein surimi dapat dilihat dari profil protein yang dihasilkan. Preparasi sampel mengikuti metode Rawdkuen *et al.* (2007) dan Benjakul *et al.* (2000). Surimi sebanyak 3 g ditambahkan dengan crude dan fraksi plasma belut dengan konsentrasi yang berbeda-beda (0, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2) (w/w), kemudian dihomogenkan. Campuran tersebut kemudian diinkubasi dalam water bath pada suhu  $55^\circ\text{C}$  selama 60 menit. Autolisis dihentikan dengan menambahkan 27 mL larutan SDS 5% ( $85^\circ\text{C}$ ). Homogenate selanjutnya diinkubasi pada suhu  $85^\circ\text{C}$  dalam water bath selama 1 jam untuk melarutkan protein total. Sampel kemudian disentrifuse pada 1811 rcf selama 20 menit. Supernatan yang didapatkan selanjutnya dilihat pola autolisis protein miofibril yang ditentukan menggunakan SDS-PAGE mengikuti metode Laemmli (1970). Konsentrasi gel pemisah yang digunakan yaitu 12%, sedangkan gel pengumpul (stacking gel) 4%.

##### 3.3.2.8.2 Persen Penghambatan Autolisis Surimi

Persen penghambatan terhadap autolisis pada surimi dilakukan dengan menambahkan crude plasma dan fraksi plasma darah terhadap 3 gram surimi

dengan konsentrasi yang berbeda-beda (0, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2) (w/w), kemudian dihomogenkan dengan ditempatkan dalam wadah yang berisi es untuk menjaga suhu 0-4°C. Sampel kemudian diinkubasi pada suhu 55 °C selama 2 jam. Reaksi autolisis dihentikan dengan menambahkan 27 mL TCA 5% dingin. Campuran tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 4°C selama 15 menit dan disentrifuse pada 1811 x g selama 25 menit. Peptida-peptida yang terlarut dalam TCA diukur berdasarkan Lowry *et al.* (1951). Tirosin digunakan sebagai standar dan diekspresikan sebagai mmol tirosin yang dilepaskan. Perhitungan persen penghambatan mengikuti formulasi di bawah ini:

$$\text{Penghambatan (\%)} = \frac{(\text{TC}-\text{TC}_b) - (\text{TS}-\text{TS}_b)*100}{\text{TC}-\text{TC}_b}$$

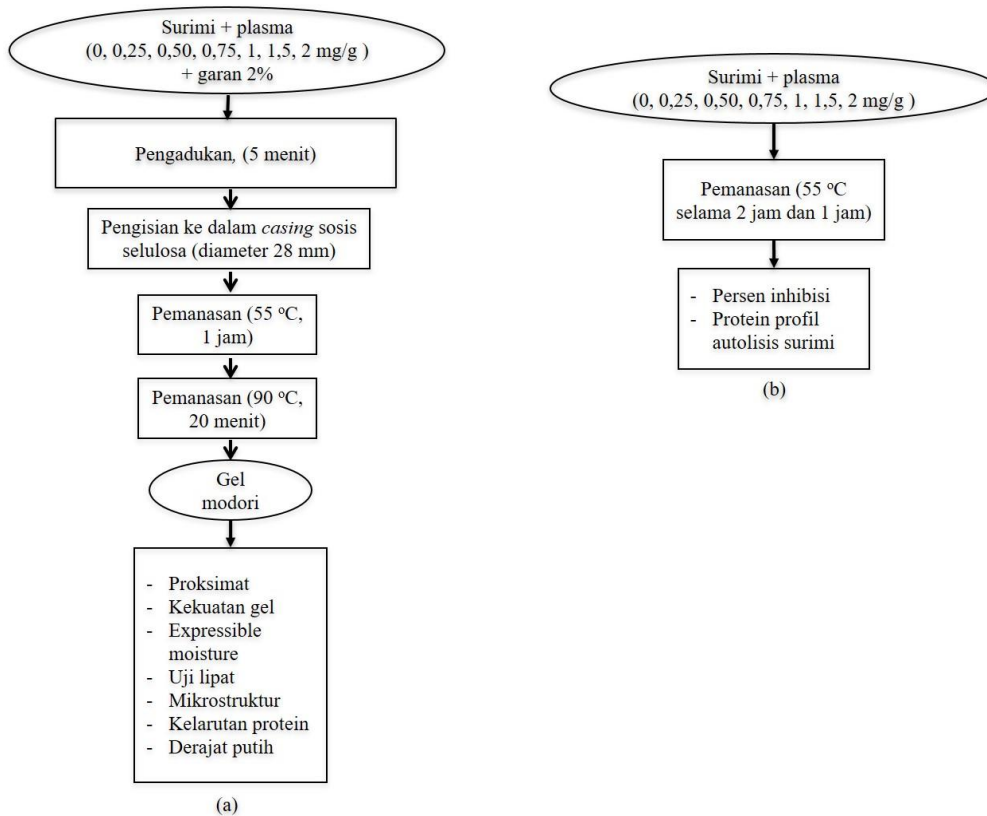
Dimana:

TC= Tirosin dari kontrol (tanpa inhibitor) yang diinkubasi pada suhu 55°C

TC<sub>b</sub>= Tirosin dari kontrol (tanpa inhibitor) yang didinginkan dengan es

TS= Tirosin sampel (dengan inhibitor) yang diinkubasi pada suhu 55°C

TS<sub>b</sub>= Tirosin pada sampel (dengan inhibitor) yang didinginkan dengan es



Gambar 6 Diagram analisis penelitian tahap II, (a) gel modori, (b) autolisis surimi

### 3.4 Analisis data

Percobaan dilakukan dengan tiga kali ulangan. Analisis data yang digunakan deskriptif, *one way* ANOVA, dan Duncan.

## IV HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Fraksinasi *Crude Plasma Belut Sawah (Monopterus albus)*

Kadar proksimat mengekspresikan persentase kandungan empat komponen utama yang terdapat di ikan, diantaranya yaitu kadar air, protein, lemak dan abu. Variasi kandungan proksimat ikan yaitu kadar air 66-84%, kadar protein 15-24%, kadar lemak 0,1-22%, dan kadar abu 0,8-2% (Mishra 2022).

Tabel 6 Proksimat belut sawah (*Monopterus albus*)

Parameter	(%)
Kadar Air	79,40±1,21
Protein	17,24±0,86
Lemak	0,46±0,13
Abu	1,18±0,12

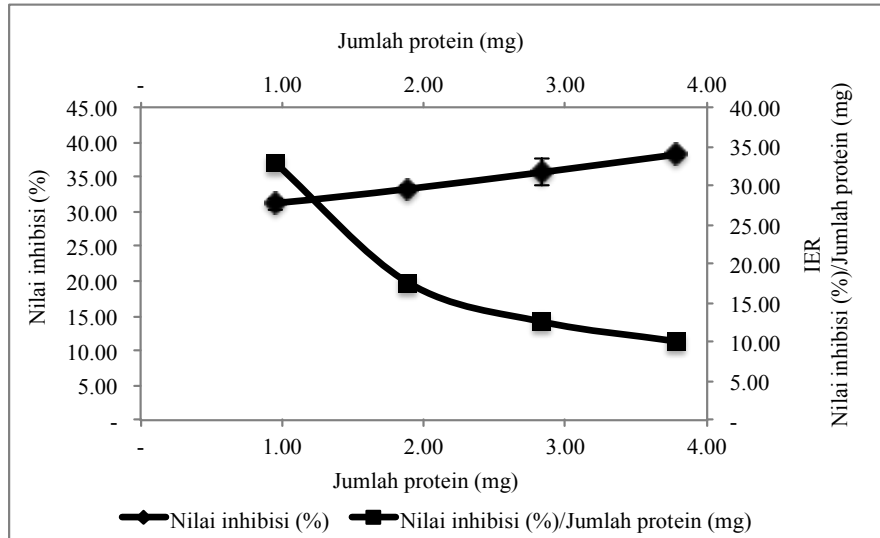
Protein merupakan salah satu komposisi penting di ikan. Ikan air laut dan air tawar adalah sumber protein yang mengandung semua asam amino esensial (Petricorena 2014). Kadar protein pada plasma dan fraksi plasma belut sawah dapat dilihat pada Tabel 6. Secara umum kadar protein plasma berkisar 60-80 mg/mL (Phillips dan Williams 2011). Ini menunjukkan bahwa kadar protein plasma berada dalam rentang yang normal. Plasma memiliki kadar protein lebih tinggi dibandingkan fraksi plasma yang difraksinasi dengan etanol 40% dengan pH 5.5 (Tabel 7). Hal ini disebabkan proses fraksinasi menargetkan fraksi yang kaya akan alfa-2-makroglobulin. Rawdkuen *et al.* (2007) melaporkan bahwa kadar protein fraksi plasma ayam yang difraksinasi dengan ammonium sulfat menurun dibandingkan dengan plasmanya. Hal ini mengindikasikan bahwa walaupun jenis bahan kimia yang digunakan berbeda untuk proses fraksinasi, kadar protein yang dihasilkan akan menurun.

Tabel 7 Kadar protein *crude* dan fraksi plasma

Sampel	Kadar protein (mg/mL)
<i>Crude Plasma</i>	63.05±8,11
Fraksi Plasma	6.36±0,22

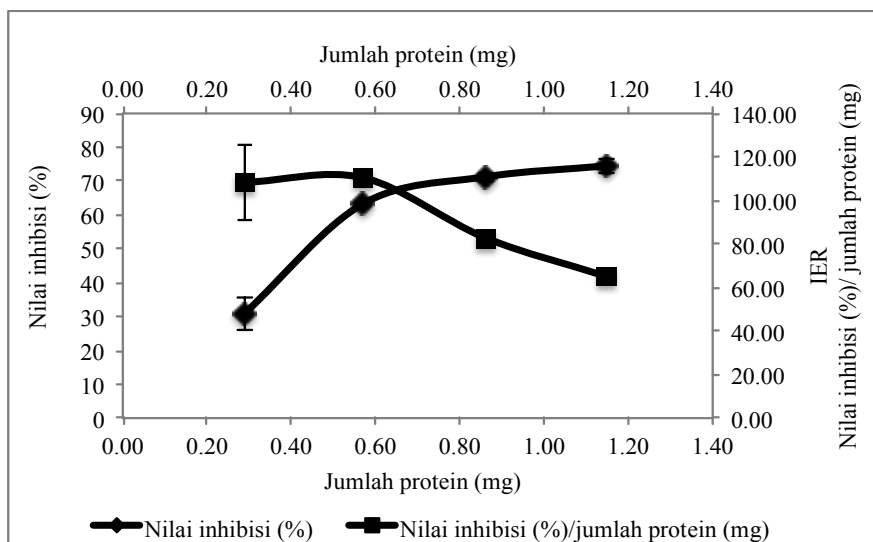
#### 4.1.1 Aktivitas Inhibitor Protease *Crude Plasma* terhadap Enzim Tripsin dan Papain.

*Crude plasma* belut memiliki aktivitas penghambatan terhadap enzim tripsin dan papain (Gambar 7 dan Gambar 8). Persen aktivitas penghambatan meningkat seiring dengan meningkatnya jumlah protein. Plasma mengandung inhibitor protease dan aktif terhadap enzim tripsin dan papain. Alfa-2-makroglobulin merupakan salah satu inhibitor protease di plasma yang mampu menghambat hampir semua kelas protease (serin, karboksil, sulfur, metaloprotease) (Rehman *et al.* 2013). Fowler dan Park (2015b) melaporkan bahwa plasma *chum salmon* dapat menghambat aktivitas tripsin dan papain. Li *et al.* (2008b) juga menemukan bahwa plasma ikan trout (*Oncorhynchus mykiss*) mampu menghambat aktivitas papain dan tripsin seiring dengan meningkatnya konsentrasi plasma yang digunakan.



Gambar 7 Aktivitas inhibitor *crude* plasma belut sawah terhadap enzim tripsin

Aktivitas inhibitor tertinggi plasma belut sawah yaitu terhadap enzim papain, dengan jumlah protein yang digunakan lebih rendah dibandingkan terhadap enzim tripsin. Hal ini membuktikan bahwa plasma belut sawah lebih efektif menghambat enzim papain daripada tripsin. Selain itu, didapatkan juga suatu cara pandang baru mengenai salah satu fungsi plasma belut sawah yaitu sebagai inhibitor protease. Tujuan pemanfaatannya yaitu mencegah terjadinya degradasi gel atau modori karena Katepsin L pada saat proses pemanasan. Aktivitas inhibitor plasma belut sawah terlihat lebih rendah (30.98-74.52%) jika dibandingkan plasma salmon (20-87%) (Fowler and Park 2015a), hal ini mungkin disebabkan perbedaan jumlah protein sampel yang digunakan.



Gambar 8 Aktivitas inhibitor *crude* plasma belut sawah terhadap enzim papain

Nilai *Inhibition Efficiency Ratio* (IER) menunjukkan hasil yang berbanding terbalik dengan aktivitas inhibitor. Semakin tinggi jumlah protein yang



digunakan untuk menghambat aktivitas enzim tripsin dan papain, maka nilai IER yang dihasilkan menurun. IER menggambarkan rasio efisiensi penghambatan (Chen *et al.* 2007) plasma terhadap enzim tripsin dan papain. IER didapatkan dengan cara membagi persen aktivitas inhibitor dengan jumlah protein yang digunakan. Semakin tinggi nilai IER, maka semakin tinggi tingkat efisiensi penghambatan terhadap enzim tripsin dan papain. Penurunan nilai IER disebabkan jumlah substrat dan enzim sama untuk setiap volume plasma yang digunakan, oleh karena itu reaksi antara substrat dan enzim menjadi jenuh. Hal ini berdampak pada kecepatan reaksi plasma sebagai inhibitor seiring dengan meningkatnya jumlah yang digunakan karena enzim yang akan diikat tersedia lebih sedikit untuk dihambat aktivitasnya.

#### 4.1.2 Aktivitas Inhibitor Protease Fraksi Plasma terhadap Enzim Papain

Analisis aktivitas inhibitor protease untuk fraksi plasma hanya terhadap enzim papain. Hal didasarkan dari hasil analisis aktivitas *crude* plasma yang lebih efektif menghambat enzim papain yang merefleksikan katepsin L. Pada Tabel 8 menunjukkan aktivitas inhibitor protease fraksi plasma belut terhadap enzim papain. Tren yang berbeda dihasilkan oleh fraksi plasma belut dibandingkan dengan plasma. Fraksi dengan jumlah protein yang lebih tinggi menghasilkan aktivitas inhibitor dan nilai IER yang tertinggi. Hal ini kemungkinan berkaitan dengan tingkat kemurnian sampel plasma. Setelah proses fraksinasi plasma menggunakan etanol 40%, produk akhir yang dihasilkan kaya akan alfa-2 makroglobulin. Oleh karena itu aktivitas inhibitor dan IER fraksi plasma lebih tinggi dibandingkan dengan plasma.

Tabel 8 Aktivitas inhibitor protease fraksi plasma belut sawah terhadap enzim papain

Sampel	Volume fraksi ( $\mu\text{L}$ )	Jumlah protein (mg)	Penghambatan (%)	IER
Fraksi Plasma	25	0,11	10,43	93,59 $\pm$ 17,22
	100	0,44	56,99	128,56 $\pm$ 0,02

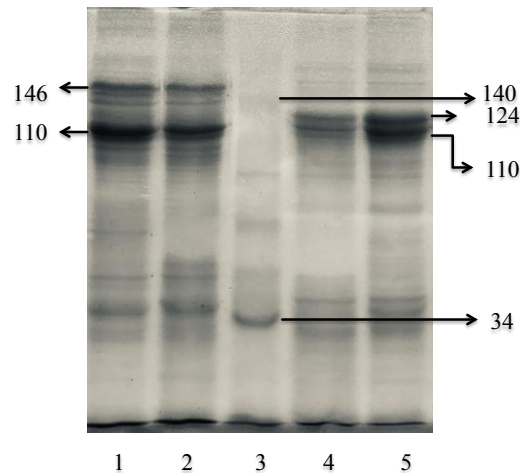
#### 4.1.3 Profil Protein *Crude* dan Fraksi Plasma Belut Sawah

Pada penentuan profil protein, sampel dalam kondisi tereduksi dan mengalami proses pemanasan maupun tanpa pemanasan. Dua pita protein dengan berat molekul 146 kDa dan 110 kDa terlihat jelas di sampel *crude* plasma. Li *et al.* (2008b) melaporkan bahwa pita protein dengan berat molekul 60, 80, 110, 180 kDa terdeteksi pada plasma ikan trout. Di sisi lain, dua pita protein dengan berat molekul 120 kDa dan 110 kDa terdeteksi di sampel fraksi plasma. Profil protein *crude* plasma dan fraksi plasma dapat dilihat pada Gambar 9.

Pada penelitian Li dan Lu (2006), alfa-2-makroglobulin pada plasma ikan koan terdiri dari dua subunit yang berbeda yaitu dengan berat molekul 95 kDa dan 80 kDa setelah proses purifikasi dengan kromatografi pertukaran ion. Chuang *et al.* (2013) melaporkan, hasil SDS-PAGE plasma ikan kerapu lumpur menghasilkan pita protein dengan berat molekul 380 kDa pada *native* PAGE, 180 kDa pada *non reduced* SDS-PAGE, serta 97 kDa dan 80 kDa setelah proses purifikasi dengan kromatografi interaksi hidropobik. Proses purifikasi

menyebabkan protein menjadi terpisah. Keberadaan merkaptotanol dalam buffer sampel dan proses pemanasan sampel setelah proses pencampuran dengan buffer sampel sebelum dimasukkan ke dalam sumur gel SDS-PAGE menyebabkan protein terdenaturasi.

Berdasarkan hasil SDS-PAGE pada penelitian ini, setelah proses fraksinasi dengan etanol 40%, diperkirakan protein kompleks alfa-2 makroglobulin pada plasma belut sawah terdiri dari subunit dengan berat molekul 120 kDa dan 110 kDa. Protein yang dihasilkan masih memerlukan tahap pemurnian untuk mengkonfirmasi karakteristiknya.



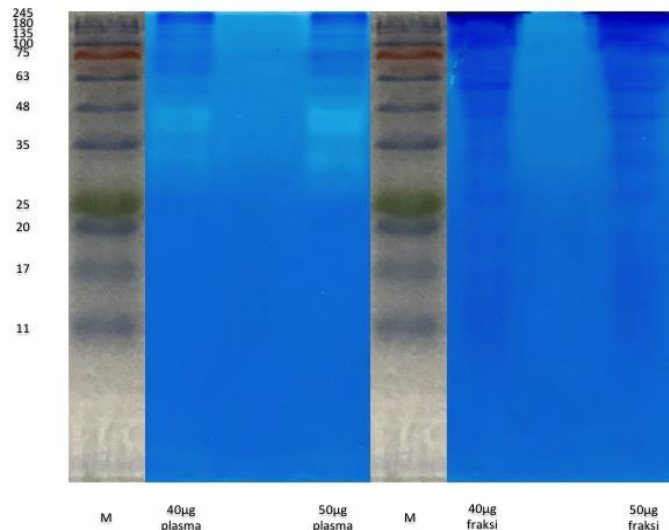
Gambar 9 Profil protein *crude* dan fraksi plasma belut sawah (1. *Crude* plasma + merkaptotanol, dipanaskan; 2. *Crude* plasma + merkaptotanol, tidak dipanaskan; 3. Marker; 4. Fraksi plasma + merkaptotanol, tidak dipanaskan; 5. Fraksi plasma + merkaptotanol, dipanaskan)

#### 4.1.4 Zimogram plasma dan fraksi plasma belut sawah

Zimogram merupakan pengembangan teknik elektroforesis yang digunakan untuk mendeteksi keberadaan enzim hidrolitik berdasarkan degradasi substrat yang ditambahkan pada gel elektroforesis. Tujuan zimogram sama halnya dengan elektroforesis, yaitu untuk memisahkan enzim berdasarkan berat molekulnya. Pada penelitian ini, analisis zimogram ditujukan untuk melihat keberadaan enzim protease pada *crude* dan fraksi plasma belut sawah yang divisualisasi pada gel elektroforesis dalam bentuk pita bening. Jiang *et al.* (2019) membuktikan bahwa terdapat aktivitas Katepsin L pada komponen darah ikan ekor kuning diantaranya yaitu pada sel darah putih, sel darah merah dan plasma.

Hasil zimogram *crude* dan fraksi plasma belut sawah dapat dilihat pada Gambar 10. Dari gambar terlihat bahwa pada *crude* plasma terdapat dua pita bening yang menandakan bahwa terdapatnya protease. Hal ini dibuktikan dengan terjadinya penurunan intensitas miosin pada profil protein surimi ikan mujair setelah dipanaskan pada suhu 55 °C, ketika penambahan konsentrasi *crude* plasma yang digunakan semakin meningkat. Selain hal tersebut, terjadi juga penurunan nilai kekuatan gel ketika konsentrasi *crude* plasma yang digunakan semakin meningkat. Pita bening yang dihasilkan semakin terlihat

jelas ketika semakin meningkat konsentrasi protein sampel yang digunakan. Keberadaan pita bening terletak pada kisaran berat molekul 48 dan 35 kDa. Sedangkan pada sampel fraksi plasma, pita bening yang menandakan keberadaan protease tidak dihasilkan.



Gambar 10 Zimogram plasma dan fraksi plasma belut sawah dengan konsentrasi kasein 0,75%

Pada ikan mas perak (*Hypophthalmichthys molitrix*), dari hasil purifikasi didapatkan katepsin L yang memiliki berat molekul 45 kDa (Wang *et al* 2021). Ikan *rock bream* memiliki ukuran berat molekul Katepsin L yaitu 38 kDa (Whang *et al.* 2011). Berdasarkan penelitian Ahimbisibwe *et al.* (2010), membran sel darah merah ikan kurisi merah terdeteksi protease yaitu Katepsin L yang memiliki berat molekul 30 kDa. Berdasarkan hasil penelitian yang didapatkan, proses fraksinasi dapat menghilangkan keberadaan katepsin L yang terdapat di *crude* plasma, selain itu perlunya dilakukan proses purifikasi lebih lanjut untuk memastikan berat molekul Katepsin L pada plasma belut sawah.

#### 4.1.5 Uji Asam Amino *Crude* dan Fraksi Plasma Belut Sawah

Pada data kandungan protein *crude* dan fraksi plasma terlihat bahwa kandungan protein *crude* plasma lebih tinggi dibandingkan dengan plasma hasil fraksinasi dengan etanol. Hal ini disebabkan tujuan fraksinasi adalah mendapatkan plasma yang kaya akan alfa-2-makroglobulin. Pada Tabel 9 dapat dilihat kandungan asam amino masing-masing plasma. Hasil analisis menunjukkan bahwa terjadi penurunan persentase asam amino setelah dilakukan proses fraksinasi, akan tetapi tidak menyebabkan berkurangnya jenis asam amino pada sampel. Kandungan asam amino paling tinggi pada kedua tipe plasma adalah asam amino glutamat, dan yang paling terendah adalah metionin. Parés *et al.* (2011) mengungkapkan bahwa darah rendah akan kandungan asam amino esensial metionin serta isoleusin. Berdasarkan rasio antara asam amino hidropobik dan hidrofilik, rasio persentase asam amino hidropobik dan hidrofilik pada *crude* plasma yaitu 37,12% : 29%, sedangkan setelah proses fraksinasi perbandingannya yaitu 32,96% : 32,12%. Hal ini mengindikasikan bahwa, penurunan asam amino karena proses fraksinasi,

bahkan terjadi peningkatan asam amino hidrofilik sebesar 3,12%. Terdapatnya kandungan 17 asam amino yang terdiri dari asam amino esensial dan nonesensial pada plasma belut sawah, maka tidak menutup kemungkinan pemanfaatannya sebagai sumber protein, baik untuk produk pangan maupun non pangan (pakan hewan).

Tabel 9 Kandungan asam amino *crude* dan fraksi plasma belut sawah (*Monopterus albus*)

Asam Amino	Jumlah (% w/w) Crude Plasma	Jumlah (% w/w) Fraksi Plasma
Aspartic Acid	0.46	0.29
Threonin	0.27	0.24
Serine	0.23	0.21
<b>Glutamate</b>	<b>0.60</b>	<b>0.46</b>
Proline	0.19	0.14
Glycine	0.17	0.14
Alanine	0.24	0.13
Cystine	0.11	0.09
Valine	0.27	0.22
Methionine	0.06	0.04
Isoleusine	0.19	0.13
Leusine	0.41	0.24
Tyrosine	0.16	0.15
Phenylalanine	0.20	0.14
Histidine	0.24	0.27
Lysine	0.37	0.26
Arginine	0.48	0.41
<b>Amino Acid Total</b>	<b>4.66</b>	<b>3.58</b>

## 4.2 Pemanfaatan Plasma Belut Sawah (*Monopterus albus*) dalam Menghambat Autolisis Surimi Ikan Mujair (*Oreochromis mossambicus*)

### 4.2.1 Proksimat Surimi

Hasil analisis proksimat surimi ikan mujair dapat dilihat pada Tabel 10. Surimi yang diukur kadar airnya merupakan *raw* surimi tanpa adanya penambahan bahan lain seperti krioprotektan. Kadar air surimi ikan mujair relatif tinggi 82,53%. Nopianti *et al.* (2012) melaporkan bahwa kadar air *raw* surimi ikan kurisi yaitu 81%. Hall (2012) mengungkapkan bahwa kadar air surimi komersil tanpa penambahan krioprotektan 80-85% dan setelah penambahan krioprotektan kadar air surimi menjadi 75-80%.

Kadar protein surimi ikan mujair relatif tinggi yaitu 14,86%. Piggot dan Tucker (2017) mengungkapkan, surimi yang terbuat dari ikan pollock memiliki kadar protein 15,2%. Protein yang terdapat di ikan terbagi menjadi tiga, yaitu protein sarkoplasmik, miofibril, dan stroma. Proporsi yang tertinggi yaitu protein miofibril (65%) (Mishra 2022). Protein miofibril adalah protein yang paling berperan pada pembentukan gel.

Kadar abu surimi relatif rendah yaitu 0,22%. Kadar abu dipengaruhi proses pencucian dalam tahapan pembuatan surimi. Shahidi (2006) mengungkapkan

bahwa daging ikan giling tanpa proses pencucian mengandung lebih banyak kadar abu dibandingkan yang melalui tahap pencucian.

Kadar lemak surimi ikan mujair relatif rendah yaitu 0,36%. Pada surimi yang terbuat dari ikan pollock, kadar lemak yang dikandungnya yaitu 0,9%. Proses pencucian meminimalkan kandungan lemak yang terdapat di surimi. Kandungan nutrisi di surimi sangat tergantung dari jenis ikan yang digunakan, musim, dan kematangan seksual ikan. Dari segi bahan baku yang digunakan, ikan terdiri 5 kelompok berdasarkan rata-rata kandungan protein dan lemak, diantaranya yaitu: a. ikan kadar lemak rendah (<5%), protein tinggi (15-20%), b. kadar lemak sedang (5-15%), tinggi protein (15-20%), c. kadar lemak tinggi (>15%), protein rendah (<15%), d. kadar lemak rendah (<5%), protein sangat tinggi (>20%), e. kadar lemak rendah (<5%), protein rendah (<15%) (Mishra 2022). Surimi yang terbuat dari ikan yang ditangkap pada saat *feeding period* umumnya menghasilkan karakteristik surimi yang baik. Hal ini disebabkan daging ikan kadar airnya rendah, sehingga kandungan proteinnya menjadi meningkat (Shahidi 2006).

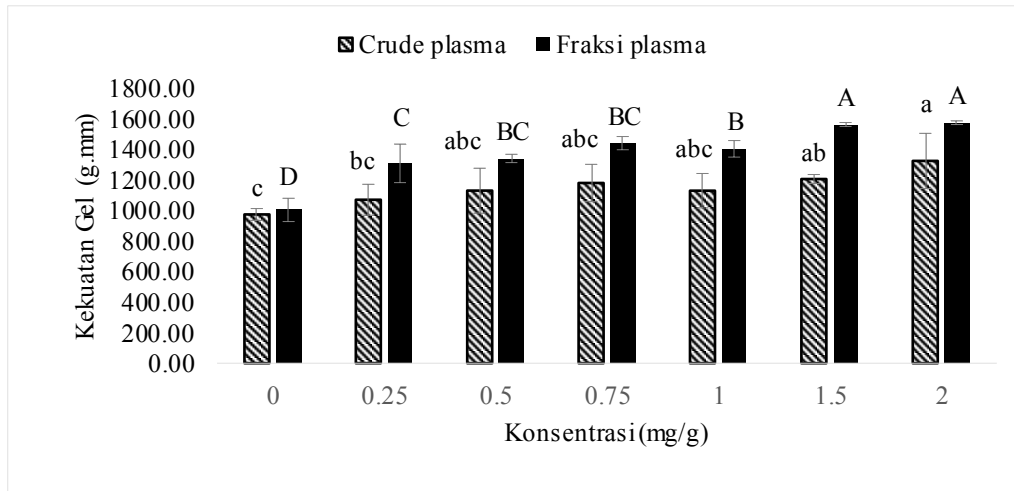
Tabel 10 Proksimat surimi ikan mujair (*Oreochromis mossambicus*)

Analisis Proksimat Surimi	Satuan (%)
Air	82,53±0,86
Protein	14,86±0,79
Abu	0,22±0,03
Lemak	0,36±0,17

#### 4.2.2 Karakteristik Tekstur Gel *Modori* Surimi

Gel *modori* tanpa penambahan *crude* plasma dan fraksi plasma belut sawah menunjukkan nilai kekuatan gel yang paling rendah. Li *et al.* (2008b) melaporkan gel *modori* Alaska Pollock menghasilkan kekuatan gel lebih rendah tanpa adanya penambahan plasma ikan trout. Pada Gambar 11 terlihat bahwa keberadaan inhibitor protease (*crude* dan fraksi plasma) meningkatkan kekuatan gel surimi. Mishra (2022) mengungkapkan, surimi yang berkualitas baik memiliki nilai kekuatan gel di atas 1000 g.cm. Gel surimi yang ditambahkan fraksi plasma menghasilkan kekuatan gel yang lebih baik dibandingkan *crude* plasma. Hal ini mengindikasikan bahwa fraksi plasma dapat melindungi surimi ikan mujair dari pelunakan gel dibandingkan dengan *crude* plasma.

Selain itu, secara umum semakin meningkatnya konsentrasi inhibitor yang digunakan, maka kekuatan gel yang dihasilkan juga semakin meningkat. Fowler *et al.* (2015b) melaporkan bahwa kekuatan gel dari gel *modori* surimi *pacific whiting* mengalami peningkatan seiring dengan meningkatnya konsentrasi plasma ikan salmon yang digunakan (0,5g/100g – 1g/100 g). Li *et al.* (2008b) menyebutkan bahwa yang berperan utama pada pembentukan gel surimi adalah keberadaan alfa-2-makroglobulin di dalam plasma sehingga surimi terhidar dari autolisis karena aktivitas Katepsin L yang tergolong pada sulfidril protease.



Gambar 11 Kekuatan gel (g.mm) *modori* surimi ikan mujair pada perbedaan konsentrasi inhibitor dan tipe plasma (angka yang disertai huruf yang berbeda menunjukkan beda nyata pada uji lanjut Duncan ( $P < 0,5$ ))

#### 4.2.3. Uji *Expressible Moisture* Gel *Modori* Surimi Ikan Mujair

*Expressible moisture* mengekspresikan jumlah cairan yang terlepas dari gel surimi karena adanya tekanan atau beban yang diberikan. Teknik tekanan merupakan salah satu cara untuk analisis *expressible moisture*, dan teknik sentrifugasi adalah metode yang lainnya. (Shand 2012). *Expressible moisture* merupakan kualitas atribut sekunder untuk analisis gel surimi yang dimasak.

Gel *modori* tanpa penambahan *crude* plasma dan fraksi plasma belut sawah menunjukkan nilai *expressible moisture* yang lebih tinggi. Li *et al.* (2008b) melaporkan gel *modori* Alaska Pollock menghasilkan nilai *expressible moisture* lebih rendah tanpa adanya penambahan plasma ikan trout. Kaewudom *et al.* (2013) mengungkapkan bahwa jaringan protein yang telah rusak strukturnya menyebabkan hilangnya kemampuan menahan air, sehingga nilai *expressible moisture* meningkat. Kerusakan struktur protein pada gel surimi disebabkan oleh aktivitas enzim protease, yang diistilahkan sebagai autolisis (Payne 2019).

Tabel 11 Nilai *expressible moisture* gel *modori* ikan mujair berdasarkan perbedaan konsentrasi dan tipe plasma

Konsentrasi (mg/g)	<i>Expressible moisture</i> (%)	
	<i>Crude</i> plasma	Fraksi Plasma
0	12,91 ± 1,53 <sup>a</sup>	9,7 ± 0,76 <sup>a</sup>
0,25	7,91 ± 0,83 <sup>b</sup>	7,19 ± 0,35 <sup>b</sup>
0,5	6,79 ± 0,31 <sup>bcd</sup>	6,89 ± 0,41 <sup>b</sup>
0,75	6,06 ± 0,21 <sup>cd</sup>	6,86 ± 0,76 <sup>b</sup>
1	7,20 ± 0,34 <sup>bcd</sup>	6,95 ± 0,26 <sup>b</sup>
1,5	7,49 ± 0,86 <sup>bc</sup>	6,58 ± 0,03 <sup>b</sup>
2	5,99 ± 0,33 <sup>d</sup>	5,11 ± 0,21 <sup>c</sup>

Ket: angka yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada tingkat kepercayaan 95%

Pada Tabel 11 terlihat bahwa keberadaan inhibitor protease (*crude* dan fraksi plasma) menurunkan nilai *expressible moisture* gel modori. Gel surimi yang ditambahkan fraksi plasma menghasilkan *expressible moisture* yang lebih baik dibandingkan *crude* plasma. Selain itu, berdasarkan konsentrasi inhibitor yang digunakan, secara umum *expressible moisture* yang dihasilkan semakin menurun seiring meningkatnya konsentrasi inhibitor yang digunakan. Hal ini mengindikasikan bahwa semakin meningkat konsentrasi inhibitor yang digunakan, maka surimi ikan mujair dapat terlindungi dari kerusakan struktur protein yang disebabkan oleh enzim protease dan yang paling efektif yaitu menggunakan fraksi plasma.

#### 4.2.4 Uji Lipat Gel *Modori* Surimi Ikan Mujair

Uji lipat bertujuan untuk melihat elastisitas gel modori ikan mujair. Uji lipat merupakan salah satu atribut sensori yang sangat penting (Park 2013). Umumnya uji lipat dilakukan untuk mengukur kualitas gel. Uji lipat tergolong pada kualitas atribut sekunder untuk analisis gel surimi yang dimasak. Tabel 12 menunjukkan bahwa gel modori yang ditambahkan *crude* plasma memiliki sifat elastis yang lebih rendah jika dibandingkan dengan yang ditambahkan fraksi plasma. Hal ini mengindikasikan bahwa fraksi plasma mampu melindungi surimi dari kerusakan struktur protein pada saat pembentukan matriks gel yang disebabkan oleh enzim protease. Secara umum, semakin tinggi konsentrasi plasma yang digunakan semakin tinggi nilai uji lipat. Hasil ini juga berkorelasi dengan hasil uji kekuatan gel dan mikrostruktur gel modori. Garam juga berperan penting dalam meningkatkan nilai uji lipat, karena garam meningkatkan kekuatan ion dari surimi, sehingga melarutkan aktomiosin yang merupakan komponen pada pembentukan gel (Pigott dan Tucker 2017).

Tabel 12 Pengaruh tipe plasma dan konsentrasi inhibitor (*crude* plasma dan fraksi plasma) terhadap uji lipat gel *modori* surimi ikan mujair

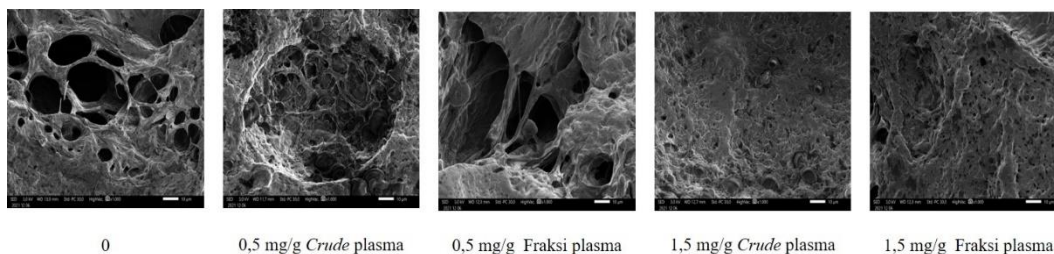
Konsentrasi (mg/g)	Tipe Plasma	
	<i>Crude</i> Plasma	Fraksi Plasma
0	2 ± 0	2 ± 0,33
0,25	2 ± 1	3 ± 0,73
0,5	3 ± 0	4 ± 0,53
0,75	3 ± 0	4 ± 0,53
1	3 ± 0	4 ± 0,53
1,5	3 ± 1	4 ± 0,50
2	3 ± 1	4 ± 0,53

#### 4.2.5 Mikrostruktur gel modori surimi dengan penambahan *crude* dan fraksi plasma belut sawah

Perubahan mikrostruktur gel modori setelah penambahan *crude* dan fraksi plasma belut sawah dapat dilihat dengan menggunakan *scanning electron microscope*. Hal ini bertujuan untuk membuktikan degradasi protein yang disebabkan oleh enzim protease, khususnya katepsin L, serta penghambatan degradasi protein oleh *crude* dan fraksi plasma. Pada Gambar 12 terlihat bahwa gel modori tanpa penambahan inhibitor protease dan dengan penambahan 0,5

mg/g *crude* dan fraksi plasma terdapat rongga/pori dengan ukuran yang relatif besar.

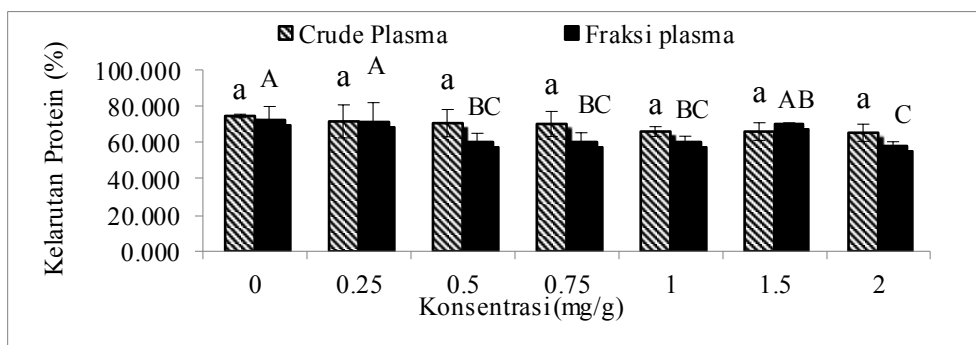
Kondisi serupa juga terjadi pada gel modori yang terbuat dari surimi ikan *Pacific whiting*, gel modori tanpa penambahan plasma ikan salmon terdapat banyak rongga dan strukturnya kurang kompak dibandingkan dengan gel modori yang ditambahkan dengan plasma ikan salmon (Fowler dan Park 2015b). Hal yang berbeda ditemukan pada gel modori dengan penambahan 1,5 mg/g *crude* dan fraksi plasma belut sawah, jaringan gel yang terbentuk lebih kompak/padat dan homogen. Hu *et al.* (2012) mengungkapkan bahwa selama proses pembentukan gel, protein semuanya teragregasi membentuk matriks gel, yang kemudian terjadinya pengikatan air oleh matriks gel untuk membentuk jaringan gel yang kompak dan lebih homogen. Hal ini mengindikasikan bahwa plasma belut sawah dapat melindungi surimi ikan mujair dari degradasi protein pada saat pembentukan gel modori pada suhu 55°C yang disebabkan oleh enzim protease, khususnya katepsin L.



Gambar 12 Mikrostruktur modori gel dengan penambahan *crude* dan fraksi plasma belut sawah dengan konsentrasi yang berbeda (0, 0,5, 1,5 mg/g)

#### 4.2.6 Kelarutan Protein Gel *Modori* Ikan Mujair

Gel *modori* tanpa penambahan *crude* plasma dan fraksi plasma belut sawah menunjukkan nilai kelarutan protein yang tertinggi (Gambar 13). Tren yang sama juga ditunjukkan oleh gel *modori* yang terbuat dari surimi ikan Alaska pollock. Kelarutan protein tertinggi dihasilkan pada *modori* gel surimi ikan Alaska pollock tanpa adanya penambahan plasma ikan trout (Li *et al.* 2008b).



Gambar 13 Kelarutan protein gel *modori* surimi ikan mujair pada perbedaan konsentrasi dan tipe plasma (angka yang disertai huruf yang berbeda menunjukkan beda nyata pada uji lanjut Duncan ( $P < 0,5$ ))



Pada Gambar 5b terlihat bahwa keberadaan inhibitor yaitu *crude* plasma dan fraksi plasma menurunkan kelarutan protein. Nilai kelarutan protein terendah dihasilkan oleh gel *modori* yang ditambahkan fraksi plasma. Hal ini mengindikasikan bahwa fraksi plasma mampu mempertahankan struktur protein surimi dari kerusakan karena aktivitas Katepsin L pada suhu 55 °C.

#### 4.2.7 Uji Derajat Putih Gel *Modori* Surimi

Perubahan nilai derajat putih gel *modori* yang terbuat dari surimi ikan mujair dengan penambahan *crude* dan fraksi plasma belut sawah pada konsentrasi yang berbeda dapat dilihat pada Tabel 13. Dari tabel terlihat bahwa, gel *modori* tanpa penambahan *crude* dan fraksi plasma memiliki nilai derajat putih yang lebih tinggi dibandingkan dengan konsentrasi lainnya. Semakin meningkat konsentrasi *crude* dan fraksi plasma yang digunakan, maka semakin menurun nilai derajat putih gel *modori*. Nilai derajat putih yang terendah dihasilkan oleh gel *modori* dengan penambahan *crude* plasma pada konsentrasi 2.0 mg/g. Menurunnya nilai derajat putih gel *modori* disebabkan hemolisis yang terjadi pada sel darah merah. Hemolisis merupakan masalah yang sering dijumpai untuk hal preparasi sampel plasma. Perubahan warna plasma dari yang oranye transparan menjadi merah gelap karena terlepasnya hemoglobin sebagai dampak dari pecahnya membran eritrosit (Fowler dan Park (2015a); Li *et al.* (2008b)).

Tabel 13 Nilai derajat putih gel *modori* ikan mujair pada perbedaan konsentrasi plasma dan tipe plasma

Konsentrasi (mg/g)	Derajat Putih	
	<i>Crude</i> plasma	Fraksi Plasma
0	68.21 ± 1.10 <sup>a</sup>	63.26 ± 1.26 <sup>a</sup>
0.25	67.43 ± 0.22 <sup>a</sup>	63.15 ± 0.17 <sup>a</sup>
0.5	66.63 ± 3.71 <sup>a</sup>	63.14 ± 0.17 <sup>a</sup>
0.75	66.69 ± 0.31 <sup>a</sup>	63.51 ± 0.40 <sup>a</sup>
1	66.12 ± 0.33 <sup>a</sup>	61.66 ± 0.27 <sup>b</sup>
1.5	61.01 ± 0.53 <sup>b</sup>	61.56 ± 0.18 <sup>b</sup>
2	56.77 ± 0.83 <sup>c</sup>	60.76 ± 0.26 <sup>b</sup>

Ket: angka yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada tingkat kepercayaan 95%

#### 4.2.8. Inhibisi terhadap Autolisis Surimi Ikan Mujair

##### 4.2.8.1 Persen Inhibisi terhadap Autolisis Surimi

Produk perikanan segar maupun olahan sangat mudah sekali mengalami kemunduran mutu, salah satu penyebabnya yaitu enzim protease. Enzim ini menyebabkan terjadinya autolisis produk perikanan. Penggunaan inhibitor protease merupakan salah satu cara untuk menghambat atau meminimalkan terjadinya autolisis. Nilai penghambatan terhadap autolisis surimi ikan mujair dapat dilihat pada Tabel 14. *Crude* dan fraksi plasma belut yang ditambahkan ke surimi ikan mujair mampu menghambat terjadinya autolisis surimi. Jika dilihat dari tipe plasma, fraksi plasma menghasilkan nilai penghambatan terhadap autolisis yang lebih baik terhadap surimi ikan

mujair jika dibandingkan dengan *crude* plasma. Terjadi korelasi yang positif dengan peningkatan konsentrasi inhibitor yang digunakan pada nilai penghambatan autolisis surimi. Jika dilihat dari nilai penghambatan terhadap autolisis yang dihasilkan, nilai tertinggi yaitu 58,97% pada surimi yang ditambahkan fraksi plasma. Nilai ini masih rendah jika dibandingkan dengan penelitian Fowler dan Park (2015a) yang persen penghambatan autolisis terhadap surimi ikan mencapai 90% dengan konsentrasi plasma yang digunakan 0,25% hingga 2%. Berdasarkan hasil yang didapatkan, maka berpeluang untuk dilakukannya penggunaan *crude* plasma dan fraksi plasma pada konsentrasi lebih tinggi yang memungkinkan mendapatkan nilai penghambatan yang semakin baik.

Tabel 14 Pengaruh tipe plasma dan konsentrasi inhibitor (*crude* dan fraksi plasma) terhadap autolisis surimi ikan mujair

Konsentrasi (mg/g)	Persen Penghambatan	
	<i>Crude</i> plasma	Fraksi Plasma
0,25	16,15±0,00 <sup>c</sup>	17,16 ±4,90 <sup>e</sup>
0,5	21,49±2,64 <sup>bc</sup>	27,01±3,6 <sup>d</sup>
1	21,74±3,54 <sup>bc</sup>	37,41±2,59 <sup>bc</sup>
1,5	26,19±2,86 <sup>b</sup>	40,28±2,10 <sup>b</sup>
2	48,04±4,80 <sup>a</sup>	58,97±3,49 <sup>a</sup>

Ket: angka yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada tingkat kepercayaan 95%

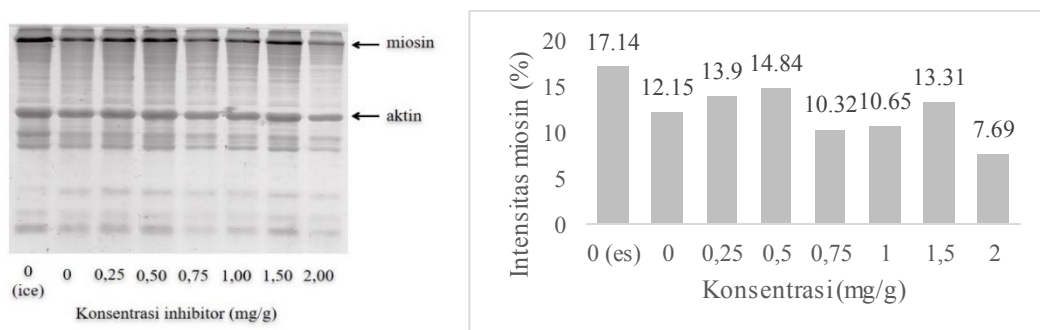
#### 4.2.8.2 Profil Protein Surimi dengan Penambahan Inhibitor (*Crude* dan Fraksi Plasma)

Metode lain yang dapat digunakan untuk melihat pengaruh penambahan inhibitor dalam penghambatan autolisis surimi yaitu dengan melihat profil proteinnya, terutama protein miosin. Pada Gambar 14 menampilkan profil protein surimi yang ditambahkan dengan *crude* plasma (a) dan fraksi plasma (b). Surimi tanpa penambahan *crude* dan fraksi plasma dan hanya dilindungi dengan es tanpa diikuti proses pemanasan pada suhu 55°C secara umum memiliki intensitas protein miosin yang tertinggi dibandingkan dengan perlakuan lainnya.

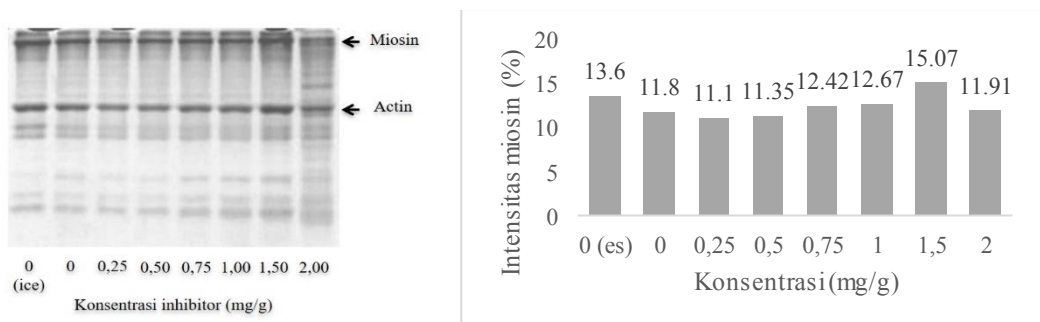
Hasil *image J* menunjukkan bahwa terjadi penurunan intensitas miosin pada sampel yang ditambahkan *crude* dan fraksi plasma. Penurunan yang drastis terhadap intensitas miosin yaitu pada sampel yang ditambahkan *crude* plasma pada konsentrasi 2,0 mg/g sebesar 55,13% dibandingkan dengan kontrol. Hal ini berkorelasi dengan hasil zimogram bahwa menurunnya intensitas miosin surimi yang ditambahkan dengan *crude* plasma disebabkan oleh keberadaan enzim protease yang ditandai dengan kemunculan dua pita bening. Sedangkan pada sampel yang ditambahkan fraksi plasma penurunan intensitas miosin tertinggi 18,62%, bahkan terjadi kenaikan intensitas miosin dengan penambahan fraksi plasma pada konsentrasi 1,50 mg/g sebesar 10,48%. Fowler dan Park (2015a) melaporkan bahwa surimi ikan *Pacific whiting* yang ditambahkan plasma secara visual terjadi peningkatan intensitas miosin (penebalan pita protein

miosin) dengan bertambahannya konsentrasi plasma ikan salmon yang digunakan.

Meningkatnya intensitas miosin mengindikasikan bahwa terjadi peningkatan penghambatan autolisis yang disebabkan oleh aktivitas protease yang terdapat di surimi. Protein aktin pada surimi ikan mujair yang ditambahkan *crude* dan fraksi plasma belut sawah terlihat cukup stabil dan tidak terlalu terpengaruh oleh aktivitas protease. Hasil yang sama juga dijumpai pada surimi ikan *Pacific whiting* yang ditambahkan plasma ikan salmon, protein aktin tidak terpengaruh oleh aktivitas protease. Berdasarkan penelitian sebelumnya, protein miosin yang paling dipengaruhi oleh aktivitas Katepsin L. Pada saat proses pencucian pada pembuatan surimi, Katepsin L tidak ikut terbuang karena terikat kuat dengan protein miofibril. Hal ini dikarenakan miosin bertindak sebagai substrat untuk protease yang terikat dengan miofibril (Fowler dan Park 2015a; Li *et al.* 2008b).



(a)



(b)

Gambar 14 Profil protein (*autolysis pattern*) surimi dengan penambahan *crude* plasma (a), fraksi plasma (b) belut sawah, dipanaskan pada suhu 55 °C dengan konsentrasi yang berbeda (mg/g), dan intensitas/luas area miosin dengan menggunakan *image J*

## V SIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Simpulan

1. Fraksinasi plasma dengan etanol 40% pH 5.5 menghasilkan aktivitas inhibitor lebih baik terhadap enzim papain (protease sulfidril) dan nilai IER yang lebih tinggi dibandingkan dengan *crude* plasma.
2. Dua pita protein dengan berat molekul protein 146 kDa dan 110 kDa terdeteksi di *crude* plasma, sedangkan di fraksi plasma terdapat 120 kDa dan 110 kDa protein yang diduga alfa-2-makroglobulin.
3. Fraksi plasma lebih baik dalam menghambat terjadinya modori gel, melalui peningkatan kekuatan gel penghambatan aktivitas protease, menurunkan *expressible moisture*, dan kelarutan protein.
4. Fraksinasi dengan etanol meniadakan enzim protease internal plasma yang diperkirakan berkorelasi dengan menurunnya protein miosin pada analisis SDS-PAGE surimi yang ditambahkan *crude* plasma.

### 5.2 Saran

Sebagai rekomendasi, diperlukan penelitian lebih lanjut dalam hal peningkatan konsentrasi *crude* dan fraksi plasma untuk memperoleh efek yang lebih signifikan dalam menjaga struktur gel surimi, serta memurnikan lebih lanjut fraksi plasma yang dihasilkan hingga didapatkan *single band* alfa 2-makroglobulin untuk memahami keunikan struktur serta mekanisme aktivitas inhibitor proteasenya.

## REFERENSI

- Abe M, Abe K, Iwabuchi K, Domoto C, Arai S. 1994. Corn cystatin I expressed in *Escherichia coli*: Investigation of its inhibitory profile and occurrence in corn kernels. *The Journal of Biochemistry*, 116(3), 488-492.
- Ahimbisibwe JB, Inoue K, Aoki T. 2010. Detection of cathepsin L in red cell membranes from fish blood. *Fisheries Science*. 76(2010): 155-159.
- Ahmad I. 2015. Instruksi kerja pangan dan produk pertanian asam amino. Bogor. Unit Laboratorium Jasa Pengujian, Kalibrasi dan Sertifikasi.
- Ahmad M, Benjakul S, Ovissipour M, Prodpran T. 2011. Indigenous proteases in the skin of unicorn leatherjacket (*Aluturus monoceros*) and their influence on characteristic and functional properties of gelatin. *Food Chemistry*. 127(2): 508-515.
- Álvarez C, Bances M, Rendueles M, Díaz M. 2009. Functional properties of isolated porcine blood proteins. *International Journal of Food Science and Technology*. 44(4): 807-14.
- Armstrong PB, Quigley. 1999.  $\alpha$ -2-Macroglobulin: an evolutionarily conserved arm of the innate immune system. *Developmental & Comparative Immunology*. 23:375-390.

- An H, Weerasinghe V, Seymour TA, Morrissey MT. 1994. Cathepsin degradation of Pacific whiting surimi proteins. *Journal of Food Science*. 59(5): 1013–1017.
- Aoki H, Ahsan MN, dan Watabe S. 2004. Molecular and enzymatic properties of a cathepsin L-like proteinase with distinct substrate specificity from northern shrimp (*Pandalus borealis*). *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*. 174(1): 59-69.
- Association of Official Analytical Chemist (AOAC). (2000). 17th Edition, The Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD, USA.
- Athipozhy A, Huang L, Wooton-Kee CR, Zhao T, Jungsuwadee P, Stromberg AJ, Vore M. 2011. Differential gene expression in liver and small intestine from lactating rats compared to age-matched virgin controls detects increased mRNA of cholesterol biosynthetic genes. *BMC Genomics*. 12: 95–111.
- Bahuaud D, Gaarder M, Veiseth-Kent E, Thomassen M. 2010. Fillet texture and protease activities in different families of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*. 310(1-2): 213-220.
- Balti R, Hmidet N, Jellouli K, Nedjar-Arroume N, Guillochon D, Nasri M. 2010. Cathepsin D from the hepatopancreas of the cuttlefish (*Sepia officinalis*): Purification and characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58(19): 10623- 10630.
- Barret AJ. 1981.  $\alpha$ 2-macroglobulin. In S.P. Colowick (Ed.), *Methods In Enzymology* (Vol. 80). New York: Academic Press, Inc.
- Benjakul S, Visessanguan W, Leelapongwattana K. 2003. Purification and characterization of heat-stable alkaline proteinase from bigeye snapper (*Priacanthus macracanthus*) muscle. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 134(4): 579-591.
- Benjakul S, Visessanguan W, Srivilai C. 2001. Porcine plasma protein as proteinase inhibitor in bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*) muscle and surimi. *Journal of The Science of Food and Agriculture*. 81: 1039-1046.
- Benjakul S, Visessanguan W. 2000. Pig plasma protein: potential use as proteinase inhibitor for surimi manufacture; inhibitory activity and the active components. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 1351-1356.
- Bradford, M.M. (1976). Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Bühling F, Fengler A, Brandt W, Welte T, Ansorge, S, Nagler DK. 2002. Review: Novel Cysteine Proteases of the Papain Family. Cellular Peptidases in Immune Functions and Diseases 2. Boston: Springer. hlm. 241-254.
- Cao MJ, Shao W, Li Y, Hara K, Wang XC, Su WJ. 2004. Identification of a myofibrillar-bound serine proteinase in the skeletal muscle of silver carp. *Journal of Food Biochemistry*. 28(5): 373-386.
- Cao MJ, Osatomi K, Hara K, Ishihara T. 2000. Identification of a myofibril-bound serine proteinase (MBSP) in the skeletal muscle of lizard fish *Saurida wanieso* which specifically cleaves the arginine site. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*. 125(2): 255-264.

- Carmeli E, Moas M, Reznick AZ, Coleman R. 2004. Matrix metalloproteinases and skeletal muscle: A brief review. *Muscle and Nerve*. 29(2): 191-197.
- Chen GW, Tsai JS, Pan BS. 2007. Purification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides and antihypertensive effect of milk produced by protease-facilitated lactic fermentation. *International Dairy Journal*, 17(6), 641-647.
- Chuang W, Liu P, Hung C, Lee K. 2014. Purification, characterization and molecular cloning of alpha-2-macroglobulin in cobia, *Rachycentron canadum*. *Fish & Shellfish Immunology*. 41:346-355.
- Chuang W, Lee K, Liu P. 2013. Characterization of alpha-2-macroglobulin from groupers. *Fish & Shellfish Immunology*. 35: 389-398.
- Chuang W, Liu P, Lee K. 2008. Purification and characterization of an alpha-2-macroglobulin protease inhibitor from plasma of the grouper *Ephinephelus coioides*. *Aquaculture*. 284: 239-245.
- Clugston M, Flemming R. 2000. Advanced Chemistry. London (UK). Oxford University Press. hlm 532.
- Cohn EJ, Strong LE, Hughes WL, Mulford DJ, Ashworth JN, Melin M, Taylor HL. 1946. Preparation and properties of serum and plasma proteins. IV. A system for separation into fractions of the proteins and lipoprotein components of biological tissues and fluids <sup>1a, b, c, d</sup>. *Journal of The American Chemical Society*, 68(3), 459-475.
- Dauch P, Vincent JP, Checler F. 1995. Molecular cloning and expression of rat brain endopeptidase 3.4. 24.16. *Journal of Biological Chemistry*. 270(45): 27266-27271.
- Del Hoyo P, Moure F, Rendueles M, Díaz M. 2007. Demineralization of animal blood plasma by ion exchange and ultrafiltration. *Meat Science*. 76(3): 402-10.
- Del Hoyo P, Rendueles M, Díaz M. 2008. Effect of processing on functional properties of animal blood plasma. *Meat Science*. 78(4): 522-8.
- Denizli A. 2011. Plasma fractionation: conventional and chromatographic methods for albumin purification. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 39(4), 315-341.
- Ellis AE. 1999. Immunity to bacteria in fish. *Fish & Shellfish Immunology*. 9: 291-308.
- Ellis AE. 1987. Inhibition of the *Aeromonas salmonicida* extracellular proteases by  $\alpha$ 2-macroglobulin in the serum of rainbow trout. *Microbial Pathogenesis*. 3(3): 167-177.
- Engild JJ, Salvesen G, Thøgersen IB, Pizzo SV. 1989. Proteinase binding and inhibition by the monomeric alpha-macroglobulin rat alpha 1-inhibitor-3. *Journal of Biological Chemistry*. 264(19): 11428-11435.
- Felberg HS, Hagen L, Slupphaug G, Batista I, Nunes ML, Olsen RL, dan Martinez I. 2010. Partial characterization of gelatinolytic activities in herring (*Clupea harengus*) and sardine (*Sardina pilchardus*) possibly involved in post-mortem autolysis of ventral muscle. *Food Chemistry*, 119(2): 675-683.
- Felman SR, Gonias SL, Pizzo SV. 1985. Model of alpha 2- macroglobulin structure and function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 82(17): 5700-5704.

- Fowler M, Park JW. 2015a. Salmon blood plasma: Effective inhibitor of protease-laden Pacific whiting surimi and salmon mince. *Food Chemistry*, 176, 448-454.
- Fowler M, Park JW. 2015b. Effect of salmon plasma protein on Pacific whiting surimi gelation under various ohmic heating conditions. *LWT - Food Science and Technology*. 61(2): 309-315.
- Fowler M. 2014. Salmon plasma protein to inhibit protease enzymes and enhance surimi gelation. Thesis. Oregon State University.
- Freedman SJ. 1991. The role of  $\alpha 2$ -macroglobulin in furunculosis: a comparison of rainbow trout and brook trout. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 98(4): 549-553.
- Gollas-Galván T, Sotelo-Mundo RR, Yepiz-Plascencia G, Vargas-Requena C, Vargas-Albores F. 2003. Purification and characterization of alpha 2-macroglobulin from the white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 134(4): 431-438.
- Hall GM. 2012. Fish Processing Technology. London: Blackie Academic & Profesional.
- Hamilton JMU, Simpson DJ, Hyman SC, Ndimba BK, Slabas AR. 2003. Ara12 subtilisin-like protease from *Arabidopsis thaliana*: purification, substrate specificity and tissue localization. *Biochemical Journal*. 370: 57-67.
- Herawati VE, Nugroho R, Pinandoyo. 2018. The growth performance and nutrient quality of Asian swamp eel *Monopterus albus* in Central Java Indonesia in freshwater aquaculture system with different feeds. *Journal of Aquatic Product Technology*. 27(6): 1-9.
- Hughes AL, Green JA, Piontkivska H, Roberts RM. 2003. Aspartic proteinase phylogeny and the origin of pregnancy-associated glycoproteins. *Molecular Biology and Evolution*. 20(11): 1940-1945.
- Hu Y, Ji R, Jiang H, Zhang J, Chen J, Ye X. 2012. Participation of cathepsin L in modori phenomenon in carp (*Cyprinus carpio*) surimi gel. *Food Chemistry*. 134(4): 2014-2020.
- Hultmann L, Rustad T. 2004. Iced storage of Atlantic salmon (*Salmo salar*) - effects on endogenous enzymes and their impact on muscle proteins and texture. *Food Chemistry*. 87(1): 31-41.
- Ishida N, Yamashita M, Koizumi N, Terayama M, Ineno T, Minami T. 2003. Inhibition of postmortem muscle softening following *in situ* perfusion of protease inhibitors in tilapia. *Fisheries Science*. 69(3): 632-638.
- Jaziri AA, Shapawi R, Mokhtar RAM, Noordin WNM, Huda N. 2021. Tropical marine fish surimi: Utilisation and potential as functional food application. *Food Reviews International*. <https://doi.org/10.1080/87559129.2021.2012794>
- Jiang T, Miyazaki R, Hirasaka K, Yuan PX, Yoshida A, Hara K, Taniyama S. 2019 Effect of blood deposition phenomenon on flesh quality of yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) during storage. *Journal of Texture Studies*. 50: 325-331.
- Kaewudom P, Benjakul S, Kijroongrojana K. 2013. Properties of surimi gel as influenced by fish gelatin and microbial transglutaminase. *Food Bioscience*. 1: 39-47.

- Kadonosono T, Kato M, Ueda M. 2007. Metallopeptidase, neurolysin, as a novel molecular tool for analysis of properties of cancer-producing matrix metalloproteinases-2 and -9. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 75(6): 1285-1291.
- Kang IS, Lanier TC. 1999. Bovine plasma proteins functions in surimi gelation compared with cysteine protease inhibitors. *Journal of Food Science*. 64: 842-846.
- Klomklao S, Benjakul S, Visessanguan W, Kishimura H, Simpson BK. 2006. Proteolytic degradation of sardine (*Sardinella gibbosa*) proteins by trypsin from skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) spleen. *Food Chemistry* 98(1): 14-22.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Leadbitter D, Guennegues P, Park J. 2020. The production of surimi and surimi seafood from tropical fish-a landscape view of the industry. Fish Matter Pty Ltd, Future Seafood, Jae Park Surimi School: Fish Matter.
- Lee JJ, Tzeng SS, Jiang ST. 2000. Purification and characterization of low molecular weight kininogen from pig plasma. *Journal of Food Science*. 65(1): 81- 86.
- Lee YZ, Aishima T, Nakai S, Sim JS. 1987. Optimization for selective fractionation of bovine blood plasma proteins using poly (ethylene glycol). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 35(6): 958-962.
- Li DK., Lin H, dan Kim SM. 2008a. Purification and characterization of a cysteine protease inhibitor from chum salmon (*Oncorhynchus keta*) plasma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56(1), 106-111.
- Li DK, Lin H, Kim SM. 2008b. Effect of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) plasma protein on the gelation of Alaska Pollock (*Theragra chalcogramma*) surimi. *Journal of Food Science*. 73(4), 227-234.
- Lødemel JB, Olsen R.L. 2003. Gelatinolytic activities in muscle of Atlantic cod (*Gadus morhua*), spotted wolffish (*Anarhichas minor*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 83(10): 1031-1036.
- Lowry OH, Rosbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193: 265-275.
- Marquez-Alvarez LR, Torres-Arreola W, Ocano-Higuera VM, Ramirez-Wong B, Marquez-Rois E. 2015. Effect of Bovine Plasma Protein on Autolysis and Gelation of Protein Extracted from Giant Squid (*Dosidicus gigas*). *Journal of Chemistry*. 2015: 1-9.
- Mishra R. 2022. Handbook on Fish Processing and Preservation. Boca Raton, FL: Taylor & Francis.
- Moure F, Rendueles M, Díaz M. 2004. Bovine plasma protein fractionation by ion exchange chromatography. *Bioprocess and Biosystem Engineering*. 27(1): 17-24.
- Murthy LN, Panda SK, Shamasundar BA. 2011. Physico-chemical and functional properties of tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Journal of Food Processing Engineering*. 34(1): 83-107.



- Mutsuro J, Nakao M, Fujiki K, Yano T. 2000. Multiple forms of  $\alpha$ 2-macroglobulin from bony fish, the common carp (*Cyprinus carpio*): striking sequence diversity in functional sites. *Immunogenetics*. 51: 847-855.
- Nalinanon S, Benjakul S, Visessanguan W, Kishimura H. 2008. Improvement of gelatin extraction from bigeye snapper skin using pepsin- aided process in combination with protease inhibitor. *Food Hydrocolloids*. 22(4): 615-622.
- Nopianti R, Herpandi, Baehaki A, Rinto, Rhidowati S, Suhartono MT. 2019. Protease inhibitory activity and protein analysis of catfish (*Pangasius hypophthalmus*) and swamp eel (*Monopterus albus*) blood plasma. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*. 42(1), 155-164.
- Nopianti R, Huda N, Fazilah A, Ismail N, Easa AM. 2012. Effect of different types of low sweetness sugar on physicochemical properties of threadfin bream surimi (*Nemipterus* spp.) during frozen storage. *International Food Research Journal*. 19(3): 1011-1021.
- Oh ES, Kim DS, Kim JH, Kim HR. 2000. Enzymatic properties of a protease from the hepatopancreas of shrimp, *Penaeus orientalis*. *Journal of Food Biochemistry*. 24(3): 251-264.
- Pangkey H, Hara K, Tachibana K, Cao MJ, Osatomi K, dan Ishihara T. 2000. Purification and characterization of cathepsin S from hepatopancreas of carp *Cyprinus carpio*. *Fisheries Science*. 66(6): 1130-1137.
- Parés D, Toldrá M, Saguer E, Carretero C. 2014. Scale-up of the process to obtain functional ingredients based in plasma protein concentrates from porcine blood. *Meat Science*. 96(1):3 04–10.
- Park JW, Graves D, Draves R, Yongsawatdigul J. 2013. *Manufacture of Surimi: Harvest to Frozen Block*. Di dalam: Park JW, editor. *Surimi and Surimi Seafood*. 3<sup>rd</sup> ed. Boca Raton, Florida: CRS Press. hlm.55-96.
- Park JW. 2013. Code of Practice for Frozen Surimi. Di dalam: Park JW, editor. *Surimi and Surimi Seafood*. 3<sup>rd</sup> ed. Boca Raton, Florida: CRS Press. hlm. 629-636.
- Park JW. 2000. Ingredient Technology and Formulation Development. Di dalam: Park JW. *Surimi and Surimi Seafood*. New York: Marcel Dekker Inc. hlm. 343-391.
- Parés D, Saguer E, Carretero C. 2011. Blood By-Product as Ingredient in Processed Meat. Di dalam: Kerry JF, editors. *Processed Meats*. Walnut Street, PA, USA: Woodhead Publishing. hlm 218-242.
- Pasciu V, Sotgiu FD, Porcu C, Berlinguer F. 2021. Effect of media with different glycerol concentrations on sheep red blood cells' viability in vitro. *Animals*. 11(6):1592. <https://doi.org/10.3390/ani11061592>
- Payne K. 2019. *Freshwater fish ecology*. Britania Raya: Edtech.
- Philips GO, Williams PA. 2011. *Handbook of Food Proteins*. Cambridge, UK: Woodhead Publishing Limited.
- Pigot GM, Tucker B. 2017. *Seafood: Effects of Technology on Nutrition*. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Pires LA, Hegg R, Freitas FR, Tavares ER, Almeida CP, Baracat EC, Maranhão RC. 2012. Effect of neoadjuvant chemotherapy on low-density lipoprotein (LDL) receptor and LDL receptor-related protein 1 (LRP-1) receptor in locally advanced breast cancer. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 45 (6):557–564.

- Poder TG, Nonkani WG, Leponkouo ÉT. 2015. Blood warming and hemolysis: A systematic review with meta-analysis. *Transfusion Medicines Reviews*. 29(3):172-180. doi: 10.1016/j.tmr.2015.03.002.
- Prakash G. 2017. Lab Manual on Blood Analysis and Medical Diagnostics. New Delhi: S.Chand and Company Ltd. hlm. 78.
- Petricorena ZC. 2014. Chemical Composition of Fish and Fishery Products. Di dalam: Cheung P, Mehta, BM, editor. Handbook of Food Chemistry, p. 1-28. Berlin, Heidelberg: Springer.
- Ramos-Clamont G, Fernández-Michel S, Carrillo-Vargas L, Martínez-Calderón E, Vázquez-Moreno L. 2003. Functional properties of protein fractions isolated from porcine blood. *Journal of Food Science*. 68(4): 1196–200.
- Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62(3): 597-635.
- Rawdkuen S, Benjakul S, Visessanguan W, Lanier TC. 2007. Cystein proteinase inhibitor from chicken plasma: Fractionation, characterization and autolysis inhibition of fish myofibrillar proteins. *Food Chemistry*. 101(4): 1647-1657.
- Rehman AA, Ahsan H, Khan FH. 2012. Alpha-2-macroglobulin: A Physiological guardian. *Journal of Cellular Physiology*. 228(8): 1665-1675.
- Roy R. 2013. Budidaya belut. Jakarta: Agromedia Pustaka.
- Seymour TA, An H, Morrissey MT, Peters MY. 1997. Surimi gel enhancement by bovine plasma proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45(8): 2919-2923.
- Shand PJ. 2012. *Water Immobilization in Low-fat Meat Batters*. Di dalam: Ho CT, Shahidi F, Xiong YL, editor. Quality Attributes of Muscle Foods. p. 339-341. Amerika Serikat: Springer US.
- Simpson BK. 2000. Digestive Proteinases from Marine Animals. Di dalam Haard NF, Simpson BK, editor. Seafood Enzymes: utilization and in uence on postharvest seafood quality. New York: Marcel Dekker. hlm. 531-540.
- Singh A, Benjakul S. 2018. Proteolysis and its control using protease inhibitors in fish and fish products: A review. *Comprehensive reviews in food science and food safety*. 17(2): 496-509.
- Skiles JW, Gonnella NC, Jeng AY. 2004. The design, structure, and clinical update of small molecular weight matrix metalloproteinase inhibitors. *Current Medicinal Chemistry*. 11(22): 2911-2977.
- Sriket C. 2014. Proteases in fish and shellfish: Role on muscle and softening and prevention. *International Food Research Journal*. 21 (1): 433-445.
- Sriket, C., Benjakul, S., Visessanguan, W., Hara, K., Yoshida, A. and Liang, X. 2012. Low molecular weight trypsin from hepatopancreas of freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*): Characteristics and biochemical properties. *Food Chemistry*. 134(1): 351-358.
- Starkey PM, Barret AJ. 1982a. Evolution of  $\alpha$ 2-macroglobulin. The demonstration in a variety of vertebrate species of a protein resembling human  $\alpha$ 2-macrglobulin. *Biochemical Journal*. 205 (1): 91-95
- Starkey PM, Barret AJ. 1982b. Evolution of  $\alpha$ 2-macroglobulin. The structure of a protein homologous with human  $\alpha$ 2-macroglobulin from plaice (*Pleuronectes platessa* L) plasma. *Biochemical Journal*. 205: 105-115.

- Tang S, Feng G, Goi R., Ren J, Zhou X, Wang H, Xu H, Zhao Y, Zeng M. 2019. Thermal gel degradation (Modori) in Sturgeon (*Acipenseridae*) surimi gel. *Journal of Food Science*. 4(12): 3601-3607.
- Tridge. 2018. Asian swamp eel. <https://www.tridge.com/intelligences/asian-swamp-eel/production>. (Diakses 6 Nopember 2018).
- Turk B, Turk D, dan Turk V. 2000. Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1477(1-2): 98-111.
- Visessanguan W, Menino AR, Kim SM, An H. 2001. Cathepsin L: A predominant heat-activated proteinase in arrowtooth ounder muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49(5): 2633-2640.
- Vishwanath W, Lilabati H, Bijen M. 1998. Biochemical, nutritional and microbiological quality of fresh and smoked mud eel fish *Monopterus albus*- a comparative study. *Food Chemistry*. 61(1/2): 153-156.
- Wang Q, Jiao X, Yan, B, Meng L, Cao H, Huang J, Zhao J, Zhang H, Chen W, Fan D. 2021. Inhibitory effect of microwave heating on cathepsin L-induced degradation of myofibrillar protein gel. *Food Chemistry*. 357:129745.
- Wasson DH. 1993. Fish muscle proteases and heat-induced myofibrillar degradation: a review. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. 1(2): 23-41.
- Weerasinghe VC, Morrissey M.T, An H. 1996. Characterization of active components in food-grade proteinase inhibitors for surimi manufacture. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 44(9): 2584-2590.
- Whang I, De Zoysa M, Nikapitiya C, Lee J. 2011. Molecular characterization and expression analysis of cathepsin B and L cysteine proteases from rock bream (*Oplegnathus fasciatus*). *Fish and Shellfish Immunology*. 30(3): 763-772.
- Wild JB, Stather PW, Sylvius N, Choke E, Sayers RD, Bown MJ. 2012. Low density lipoprotein receptor related protein 1 and abdominal aortic aneurysms. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*. 44 (2):127-132.
- Wu GP, Chen SH, Liu GM., Yoshida A, Zhang LJ, Su WJ, Cao MJ. 2010. Purification and characterization of a collagenolytic serine proteinase from the skeletal muscle of red sea bream (*Pagrus major*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*. 155(3): 281-287.
- Wu JL, Lu BJ, Du MH, Liu GM, Hara KJ, Su WJ, Cao MJ. 2008. Purification and characterization of gelatinase-like proteinases from the dark muscle of common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56(6): 2216-2222.
- Yongsawatdigul J, Hemung BO, Choi YJ. 2014. Proteolytic Enzymes and Control in Surimi. Di dalam: Park JW, editor. *Surimi and Surimi Seafood* (3 ed). Boca Raton, FL: Taylor and Francis. p. 141-167.
- Yongsawatdigul J, Piyadhamviboon P. 2004. Inhibition of autolytic activity of lizardfish surimi by proteinase inhibitors. *Food Chemistry*. 87(3): 447-455.
- Yongsawatdigul J, Park JW, Virulhakul P, Viratchakul S. 2000. Proteolytic degradation of tropical tilapia surimi. *Journal of Food Science*. 65(1): 129-133.

Zayas JF. 1997. *Functionality of Proteins in Food*. New York (NY). Springer.

**LAMPIRAN**

## RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di kota Palembang pada tanggal 1 November 1981 sebagai anak ke satu dari pasangan Cik Uni (alm) dan Msy. Rubiatun. Pendidikan sarjana ditempuh di Program Studi Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Riau, dan lulus pada tahun 2004. Pada tahun 2009, penulis diterima sebagai mahasiswa program magister (S-2) di Program Studi Ilmu Pangan pada Sekolah Pascasarjana Universiti Sains Malaysia dan menamatkannya pada tahun 2012. Kesempatan untuk melanjutkan ke program doktor pada program studi Ilmu Pangan Sekolah Pascasarjana IPB diperoleh pada tahun 2017 dengan biaya beasiswa pendidikan pascasarjana yang diperoleh dari Lembaga Pengelola Dana Pendidikan (LPDP) Kementerian Keuangan.

Penulis bekerja sebagai staf pengajar di Universitas Sriwijaya sejak tahun 2006 dan ditempatkan di Program Studi Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Pertanian, Universitas Sriwijaya.

Karya ilmiah berjudul *Protease Inhibitory Activity and Protein Analysis of Catfish (*Pangasius hypophthalmus*) and Swamp Eel (*Monopterus albus*) Blood Plasma* telah dipublikasi di jurnal *Pertanika Journal Tropical Agricultural Science*. Judul karya ilmiah lain yaitu *Protease Inhibitory Activity Profile of Indonesia Wild Swamp Eel (*Monopterus albus*)*. Karya-karya ilmiah tersebut merupakan bagian dari program S-3 penulis.