

AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN ANTIMIKROBA PEPTIDA BIOAKTIF DAGING AYAM IPB D1 HASIL HIDROLISIS DENGAN ENZIM TRIPSIN

LUTHFIANA AZ ZAHRA



**DEPARTEMEN ILMU PRODUKSI DAN TEKNOLOGI PETERNAKAN
FAKULTAS PETERNAKAN
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2026**



@Hak cipta milik IPB University

IPB University



IPB University
— Bogor Indonesia —

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Perpustakaan IPB University



PERNYATAAN MENGENAI SKRIPSI DAN SUMBER INFORMASI SERTA PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi dengan judul “Aktivitas Antioksidan dan Antimikroba Peptida Bioaktif Daging Ayam IPB D1 Hasil Hidrolisis dengan Enzim Tripsin” 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 skripsi ini.

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

Bogor, Juli 2026

Luthfiana Az Zahra
D3401221015



ABSTRAK

LUTHFIANA AZ ZAHRA. Aktivitas Antioksidan dan Antimikroba Peptida Bioaktif Daging Ayam IPB D1 Hasil Hidrolisis dengan Enzim Tripsin. Dibimbing oleh ZAKIAH WULANDARI dan CAHYO BUDIMAN.

Fraksi sarkoplasmik daging ayam IPB D1 memiliki kandungan asam amino yang berpotensi menghasilkan peptida bioaktif melalui hidrolisis enzim tripsin. Penelitian ini bertujuan menganalisis aktivitas antioksidan dan antimikroba pada fraksi sarkoplasmik tanpa hidrolisis (TP), hidrolisat optimum (HP), dan fraksi ultrafiltrasi ≤ 3 kDa (UP). Penentuan kondisi hidrolisis optimum menggunakan RAL faktorial dua arah dengan faktor konsentrasi enzim (0, 50, 100 U mL⁻¹) dan waktu inkubasi (0, 6, 12 jam), sedangkan perbandingan ketiga fraksi menggunakan RAL searah, masing-masing tiga ulangan. Aktivitas antioksidan diuji dengan metode DPPH dan aktivitas antimikroba menggunakan metode difusi cakram terhadap *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, dan *Salmonella typhi*. Kondisi hidrolisis optimum dicapai pada konsentrasi 50 U mL⁻¹ dengan waktu inkubasi 12 jam (DH 22,53%). Fraksi UP menghasilkan aktivitas DPPH tertinggi sebesar 17,28% dengan kapasitas antioksidan 23,72 mg EVC 100 g⁻¹ serta daya hambat antimikroba terkuat terhadap seluruh bakteri uji.

Kata kunci: antimikroba, antioksidan, ayam IPB D1, peptida bioaktif, tripsin

ABSTRACT

LUTHFIANA AZ ZAHRA. Antioxidant and Antimicrobial Activities of Bioactive Peptides from IPB D1 Chicken Meat Hydrolyzed with Trypsin Enzyme. Supervised by ZAKIAH WULANDARI and CAHYO BUDIMAN.

The sarcoplasmic fraction of IPB D1 chicken meat contains amino acids that have the potential to produce bioactive peptides through trypsin enzymatic hydrolysis. This study aimed to analyze the antioxidant and antimicrobial activities of the unhydrolyzed sarcoplasmic fraction (TP), optimum hydrolysate (HP), and ultrafiltration fraction of ≤ 3 kDa (UP). A two-way completely randomized design was used to determine optimum hydrolysis conditions with enzyme concentration (0, 50, 100 U mL⁻¹) and incubation time (0, 6, 12 h) as factors, while a one-way completely randomized design was used to compare the three fractions, each with three replications. Antioxidant activity was evaluated using the DPPH assay and antimicrobial activity was determined using the disk diffusion method against *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Salmonella typhi*. Optimum hydrolysis was achieved at 50 U mL⁻¹ with 12 h incubation, yielding a degree of hydrolysis of 22,53%. The UP fraction exhibited the highest DPPH inhibition of 17,28% with an antioxidant capacity of 23,72 mg EVC 100 g⁻¹ and the strongest antimicrobial inhibition against all tested bacteria.

Keywords: antimicrobial, antioxidant, bioactive peptides, IPB D1 chicken, trypsin



@Hak cipta milik IPB University

IPB University



Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

© Hak Cipta milik IPB, tahun 2026
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.



AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN ANTIMIKROBA PEPTIDA BIOAKTIF DAGING AYAM IPB D1 HASIL HIDROLISIS DENGAN ENZIM TRIPSIN

LUTHFIANA AZ ZAHRA

Skripsi
sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana pada
Program Studi Teknologi Hasil Ternak

**DEPARTEMEN ILMU PRODUKSI DAN TEKNOLOGI PETERNAKAN
FAKULTAS PETERNAKAN
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2026**



@Hak cipta milik IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Tim Penguji pada Ujian Skripsi:

- 1 Muhamad Arifin, S.Pt., M.Si.
- 2 Verika Armansyah Mendrofa, S.Pt., M.Si.
- 3 Shabrina Dyah Wibawanti, S.Pt., M.Si.

Judul Skripsi : Aktivitas Antioksidan dan Antimikroba Peptida Bioaktif Daging
Ayam IPB D1 Hasil Hidrolisis dengan Enzim Tripsin

Nama : Luthfiana Az Zahra
NIM : D3401221015

@Hak cipta milik IPB University

Disetujui oleh

Pembimbing 1:

Dr. Zakiah Wulandari, S.TP., M.Si.

Pembimbing 2:

Dr. Cahyo Budiman, S.Pt., M. Eng.

Diketahui oleh

Ketua Departemen

Ilmu Produksi dan Teknologi Peternakan:

Dr. Muhammad Baihaqi, S.Pt., M.Sc.

NIP 198001292005011005

Tanggal Ujian:

7 Juli 2026

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 Januari 2026 sampai Mei 2026 ini ialah Peptida bioaktif, dengan judul “Aktivitas Antioksidan dan Antimikroba Peptida Bioaktif Daging Ayam IPB D1 Hasil Hidrolisis dengan Enzim Tripsin”.

Terima kasih penulis ucapkan kepada para pembimbing, Ibu Dr. Zakiah Wulandari, S.TP., M. Si. dan Bapak Dr. Cahyo Budiman S,Pt., M. Eng. yang telah memberikan arahan, bimbingan, serta masukan yang sangat berharga hingga karya ilmiah ini dapat diselesaikan dengan baik. Penghargaan penulis sampaikan kepada Ibu Devi Murtini, S.Pt., MAFH. selaku Pranata Laboratorium Pendidikan (PLP), staf laboratorium, serta Fadella Haqqi Seutia, S.Pt. M.Si. yang telah mendampingi penulis selama penelitian. Ungkapan terima kasih juga disampaikan kepada orang tua tersayang, Bapak Karmu dan Ibu Eros Sukmawati, serta seluruh keluarga atas doa yang tak pernah putus, kasih sayang yang tidak pernah habis, serta dukungan yang senantiasa menguatkan selama penulis menempuh pendidikan di Institut Pertanian Bogor. Apresiasi tinggi penulis sampaikan kepada Tim Peptida Bioaktif Ayam IPB D1 yaitu, Latifudin, S.Pt. dan Muhammad Arya Ramadhan, S.Pt. yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian dan pengumpulan data di laboratorium. Penulis berterima kasih kepada Rafi Ramadhan Wijayadi yang senantiasa hadir dan setia menemani penulis sejak masa PKU hingga tersusunnya tugas akhir ini. Penulis juga turut berterima kasih kepada Olivia Syahfitriyani, Tasya Kharisma Bowi Lestari, Salsabilla Aleena Azzahra, Prameswari Humaira, Khoirun Nisa, Almasha Rahma Fauzia, atas segala dukungan, kebersamaan, dan warna yang telah diberikan selama masa perkuliahan ini. Semoga karya ilmiah ini bermanfaat bagi pihak yang membutuhkan dan bagi kemajuan ilmu pengetahuan.

Bogor, Juli 2026

Luthfiana Az Zahra



DAFTAR ISI

DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR LAMPIRAN	ix
PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan	3
1.4 Manfaat	3
METODE	
2.1 Waktu dan Tempat	4
2.2 Alat dan Bahan	4
2.3 Prosedur Kerja	4
2.4 Analisis Data	9
HASIL DAN PEMBAHASAN	
3.1 Derajat Hidrolisis (DH)	11
3.2 Konsentrasi Protein	12
3.3 Aktivitas Antioksidan	14
3.4 Aktivitas Antimikroba	16
SIMPULAN DAN SARAN	
4.1 Simpulan	19
4.2 Saran	19
DAFTAR PUSTAKA	20
LAMPIRAN	24
RIWAYAT HIDUP	28



DAFTAR TABEL

1	Komposisi hidrolisis fraksi sarkoplasmik (FS)	6
2	Nilai derajat hidrolisis pada fraksi sarkoplasmik daging ayam IPB D1 yang dihidrolisis menggunakan enzim tripsin	11
3	Aktivitas antimikroba fraksi sarkoplasmik ayam IPB D1	17

DAFTAR GAMBAR

1	Diagram alir penelitian	5
2	Perbandingan konsentrasi protein pada fraksi sarkoplasmik ayam IPB D1	13
3	Aktivitas antioksidan daging ayam IPB D1	14

DAFTAR LAMPIRAN

1	Hasil analisis ragam kapasitas antioksidan	25
2	Hasil analisis ragam % SA	25
3	Hasil analisis ragam zona bening	25
4	Hasil analisis ragam protein	25
5	Hasil analisis ragam derajat hidrolisis	25
6	Hasil uji lanjut Tukey kapasitas antioksidan	26
7	Hasil uji lanjut Tukey % SA	26
8	Hasil uji lanjut Tukey protein	26
9	Hasil uji lanjut Tukey faktor waktu derajat hidrolisis	26
10	Hasil uji lanjut Tukey faktor enzim derajat hidrolisis	26
11	Hasil uji lanjut Tukey faktor waktu*enzim derajat hidrolisis	26
12	Dokumentasi hasil uji aktivitas antimikroba	27



@Hak cipta milik IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Seiring dengan upaya pencapaian *Sustainable Development Goals* (SDGs), terutama pada tujuan ke-3 yang berfokus pada kesehatan dan kesejahteraan, berbagai inovasi terus dikembangkan, termasuk dalam bidang pangan fungsional berbasis sumber daya lokal (United Nations 2023). Pangan fungsional didefinisikan sebagai pangan yang memberikan manfaat kesehatan di luar nilai gizi dasarnya melalui komponen bioaktif yang dapat memengaruhi fungsi fisiologis secara positif (Hasler 2002). Komponen bioaktif yang mendapat perhatian besar dalam konteks ini adalah peptida bioaktif, yaitu fragmen protein spesifik yang bersifat inaktif ketika masih tersimpan dalam struktur protein induk (*parent protein*) dan baru menunjukkan aktivitas biologis setelah dilepaskan melalui proses hidrolisis (Shahidi dan Zhong 2008). Senyawa ini umumnya tersusun atas 2 hingga 20 residu asam amino dengan bobot molekul di bawah 6 kDa dan memiliki beragam aktivitas biologis penting seperti antioksidan, antimikroba, antihipertensi, imunomodulator, dan antidiabetes (Jiang *et al.* 2024; Korhonen dan Pihlanto 2006). Pasar global peptida bioaktif terus tumbuh secara signifikan dan diproyeksikan mencapai USD 2,2 miliar pada tahun 2030 (Grand View Research 2022), mencerminkan tingginya permintaan akan senyawa bioaktif alami sebagai alternatif bahan aktif farmasi dan nutrasetikal.

Aktivitas antioksidan dan antimikroba menjadi dua fungsi yang relevan untuk dikembangkan dalam konteks pangan dan kesehatan. Antioksidan berperan dalam menetralkan radikal bebas yang apabila tidak terkontrol dapat memicu stres oksidatif dan berbagai penyakit degeneratif seperti kanker, diabetes, dan kardiovaskular (Zalukhu *et al.* 2016). Peptida antimikroba bekerja dengan cara mengganggu integritas membran sel bakteri sehingga menyebabkan kebocoran konten intraseluler dan kematian bakteri, menjadikannya kandidat agen antimikroba alami yang menjanjikan di tengah meningkatnya resistensi antibiotik konvensional (Mojsoska dan Jenssen 2015). Kedua aktivitas ini umumnya dipengaruhi oleh komposisi dan urutan asam amino penyusun peptida, sehingga pemilihan substrat protein dan enzim yang tepat menjadi faktor kunci dalam menghasilkan peptida bioaktif yang efektif.

Ayam IPB D1 merupakan rumpun unggas nasional dengan keunggulan gizi dan genetik yang berpeluang menjadi sumber peptida bioaktif unik yang belum banyak dieksplorasi. Rumpun ini dikembangkan melalui persilangan antara jantan F1 PS (Pelung x Sentul) dengan betina F1 KM (Kampung x *parent stock Cobb*), menggabungkan 25% gen pertumbuhan cepat dari ayam ras pedaging dengan tiga rumpun ayam lokal unggul (Sumantri *et al.* 2023). Ayam IPB D1 memiliki performa produksi yang lebih baik serta daya adaptasi yang tinggi terhadap iklim tropis (Al Habib *et al.* 2020), dan dagingnya dilaporkan mengandung profil asam amino esensial yang relatif tinggi seperti lisin, leusin, isoleusin, histidin, treonin, dan triptofan (Sholichah 2025). Keberadaan asam amino esensial dalam jumlah tinggi ini sangat relevan karena merupakan prekursor penting bagi terbentuknya peptida bioaktif dengan beragam fungsi biologis. Pemanfaatan daging ayam hingga saat ini masih cenderung terbatas pada produk konsumsi konvensional, sehingga

terdapat peluang besar untuk mengembangkan produk bernilai tambah tinggi dari sumber daya ini.

Protein daging ayam tersusun atas dua fraksi utama, yaitu miofibrilar dan sarkoplasmik. Fraksi sarkoplasmik mengandung berbagai protein globular larut air seperti mioglobin, kreatin kinase, dan berbagai enzim metabolik, serta berkontribusi sekitar 22-25% dari konsentrasi protein otot (Akbarian *et al.* 2022). Fraksi ini memiliki keunggulan kelarutan tinggi dalam air maupun larutan *buffer* dengan kekuatan ionik rendah sehingga lebih mudah diekstraksi dan dihidrolisis dibandingkan fraksi miofibrilar. Terkait komposisinya, fraksi sarkoplasmik daging ayam IPB D1 diketahui kaya akan residu asam amino yang berperan sebagai prekursor peptida bioaktif, di antaranya lisin (8,64%), arginin (5,21%), triptofan (8,77%), dan asam glutamat (15,15%) dari konsentrasi asam amino (Alifiya 2024). Kandungan asam amino esensial yang tinggi pada fraksi ini berpotensi menghasilkan peptida dengan aktivitas biologis yang baik setelah proses hidrolisis. Hal ini didukung oleh penelitian Alifiya (2024) yang membuktikan bahwa hidrolisis fraksi sarkoplasmik daging ayam IPB D1 menghasilkan peptida dengan aktivitas antioksidan dan antimikroba yang lebih tinggi dibandingkan fraksi miofibril, menegaskan superioritas fraksi sarkoplasmik sebagai substrat produksi peptida bioaktif.

Produksi peptida bioaktif dilakukan melalui hidrolisis enzimatik, yaitu pemecahan rantai protein oleh enzim protease pada titik-titik ikatan peptida tertentu. Metode ini dipilih karena menghasilkan peptida yang lebih spesifik, aman, serta mudah dikontrol dibandingkan hidrolisis kimiawi yang cenderung tidak selektif dan berpotensi merusak struktur asam amino (Akbarian *et al.* 2022). Efektivitas proses hidrolisis dipengaruhi oleh berbagai faktor seperti suhu, pH, waktu inkubasi, konsentrasi enzim, dan jenis enzim yang digunakan, di mana faktor-faktor ini secara simultan menentukan tingkat pemutusan ikatan peptida serta karakteristik peptida yang dihasilkan (Mora dan Toldrá 2023). Perbedaan spesifisitas tiap enzim dalam memutus ikatan peptida menghasilkan peptida dengan karakteristik beragam, baik dari segi ukuran, susunan asam amino, maupun aktivitas biologis (Awosika dan Aluko 2019).

Tripsin merupakan protease serin yang secara spesifik memotong ikatan peptida pada sisi karboksil residu lisin (K) dan arginin (R) (Khirzin *et al.* 2020). Mengingat fraksi sarkoplasmik daging ayam IPB D1 mengandung lisin dan arginin dalam jumlah yang relatif tinggi (Alifiya 2024), penggunaan tripsin berpotensi menghasilkan peptida dalam jumlah dan keragaman yang besar dari substrat ini. Kinerja optimal tripsin juga didukung oleh sifatnya sebagai enzim proteolitik serin yang memiliki stabilitas termal hingga 50 °C serta mampu bekerja pada rentang pH yang luas yaitu 6,0-11,0 (Klomklao *et al.* 2007). Namun demikian, pemanfaatan enzim tripsin secara spesifik pada fraksi sarkoplasmik daging ayam IPB D1 masih belum banyak dilaporkan, sehingga kajian mengenai pengaruh variasi konsentrasi enzim dan waktu inkubasi terhadap derajat hidrolisis, kandungan protein terlarut, serta aktivitas antioksidan dan antimikroba peptida masih terbatas.

Berdasarkan uraian tersebut, penelitian ini dilakukan untuk mengeksplorasi produksi peptida bioaktif dari fraksi sarkoplasmik daging ayam IPB D1 melalui hidrolisis menggunakan enzim tripsin pada berbagai konsentrasi dan waktu inkubasi, serta mengevaluasi aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH dan aktivitas antimikroba terhadap *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*,

Escherichia coli, dan *Salmonella typhi* secara *in vitro*. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan dasar ilmiah bagi pemanfaatan peptida bioaktif dari daging ayam IPB D1 sebagai sumber senyawa fungsional yang berpotensi dikembangkan dalam bidang pangan dan kesehatan.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini masih terbatasnya informasi mengenai potensi fraksi sarkoplasmik daging ayam IPB D1 sebagai sumber peptida bioaktif yang dihasilkan melalui hidrolisis enzimatis menggunakan tripsin. Selain itu, potensi aktivitas antioksidan dan antimikroba pada fraksi tanpa hidrolisis (TP), hidrolisat optimum (HP), dan fraksi ≤ 3 kDa (UP) dari daging ayam IPB D1 masih belum banyak dilaporkan.

1.3 Tujuan

Penelitian ini bertujuan menganalisis serta membandingkan potensi aktivitas antioksidan dan antimikroba pada tiga fraksi perlakuan daging ayam IPB D1, yaitu fraksi sarkoplasmik tanpa hidrolisis (TP), hidrolisat optimum (HP), dan fraksi hasil ultrafiltrasi berukuran ≤ 3 kDa (UP).

1.4 Manfaat

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi dalam pengembangan pemanfaatan daging ayam IPB D1 melalui hidrolisis enzimatis menggunakan enzim tripsin untuk menghasilkan peptida bioaktif. Informasi mengenai potensi aktivitas antioksidan dan antimikroba yang dihasilkan penelitian ini, diharapkan dapat mengoptimalkan pemanfaatan fraksi sarkoplasmik daging ayam IPB D1. Selain itu, hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi data dasar bagi pengembangan aplikasi di bidang pangan fungsional, farmasi, serta nutrasetika, sekaligus mendorong pemanfaatan pangan lokal yang lebih luas dan berkelanjutan.





II METODE

2.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada Bulan Januari sampai Mei 2026. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Alat dan Instrumen, Laboratorium Terpadu, dan Laboratorium Mikrobiologi Divisi Teknologi Hasil Ternak, Ilmu Produksi dan Teknologi Peternakan, Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor.

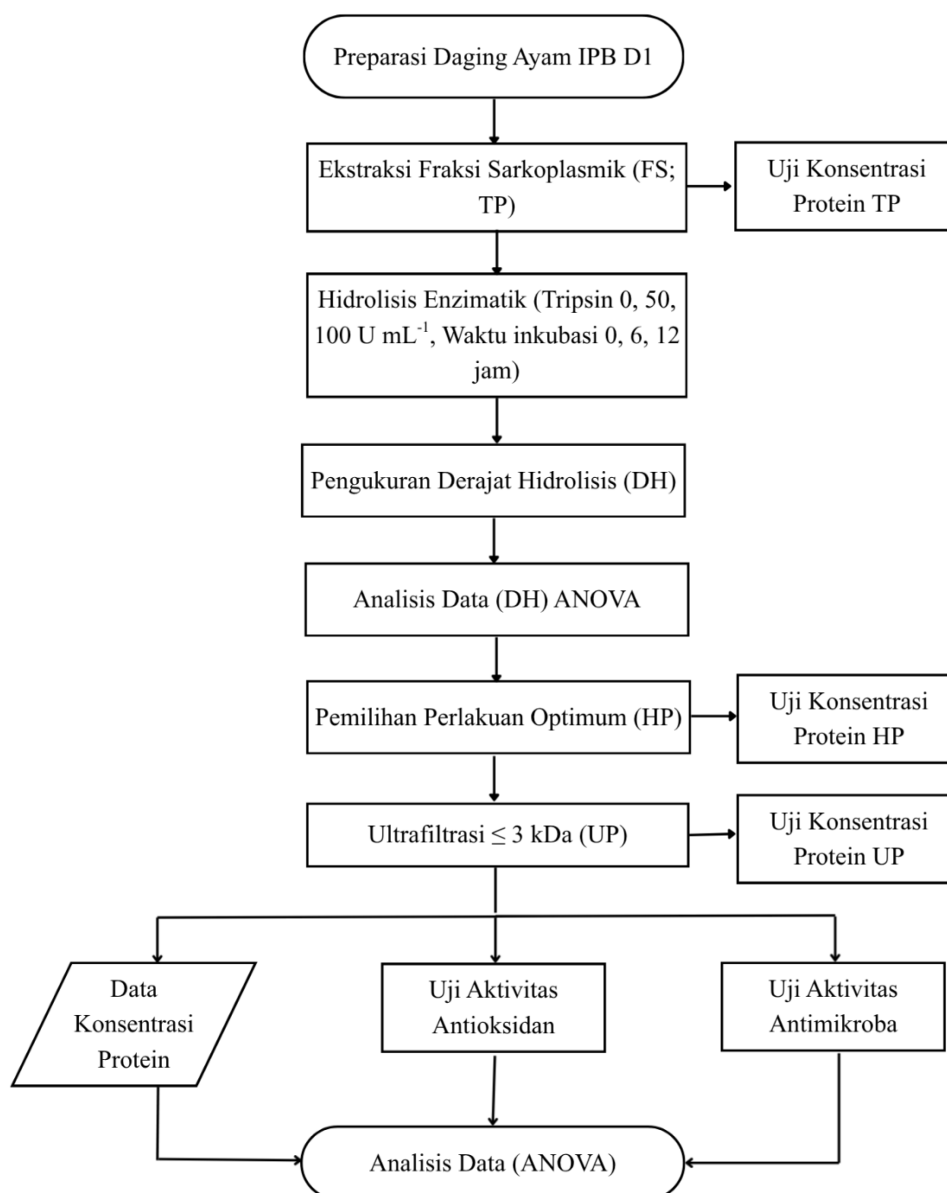
2.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain *chopper* untuk menghaluskan daging ayam, serta sentrifugasi berkecepatan tinggi yang digunakan untuk memisahkan fraksi hasil hidrolisis. Pemisahan peptida berdasarkan ukuran molekul dilakukan menggunakan membran ultrafiltrasi ≤ 3 kDa (*Sartorius Vivaspin*). Aktivitas antioksidan dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis, sedangkan aktivitas antimikroba diuji menggunakan inkubator mikrobiologi. Peralatan tambahan yang digunakan meliputi autoklaf, timbangan analitik, *vortex mixer*, *magnetic stirrer*, *waterbath*, *heatblock*, mikropipet, serta perangkat gelas laboratorium standar seperti erlenmeyer, gelas ukur, tabung reaksi, *microtube*, dan cawan petri.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi daging dada ayam segar IPB D1 sebagai sumber protein utama. Hidrolisis protein dilakukan menggunakan enzim tripsin (*Sigma-Aldrich*), dan *buffer* fosfat 0,02 M (pH 7,0). Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan menggunakan pereaksi *diphenylpicrylhydrazyl* (DPPH) serta standar menggunakan vitamin C, sementara evaluasi aktivitas antimikroba menggunakan antibiotik *amoxicillin* 50 mg mL⁻¹ serta media *nutrient agar* (NA) dan *mueller hinton agar* (MHA) dengan empat bakteri uji, yaitu *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, dan *Salmonella typhi*. Bahan pendukung lainnya meliputi L-serine, natrium tetrahydroborat, β -merkaptotetanol, NaCl, NaOH 2 N, metanol, Na₂CO₃ 2%, CuSO₄ 1%, NaK tartrat 1%, reagen *Folin Ciocalteu*, *bovine serum albumin* (BSA), serta akuades dan *aquabidest* sebagai pelarut.

2.3 Prosedur Kerja

Penelitian diawali dengan preparasi dan ekstraksi daging dada ayam IPB D1 untuk memperoleh fraksi protein sarkoplasmik tanpa hidrolisis (TP) yang langsung diuji konsentrasi protein terlarutnya, dilanjutkan dengan hidrolisis enzimatik menggunakan enzim tripsin pada berbagai variasi konsentrasi dan waktu inkubasi. Nilai derajat hidrolisis (DH) yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan ANOVA untuk menentukan perlakuan optimum (HP) yang setelah terpilih segera diukur kembali konsentrasi protein terlarutnya. Hidrolisat optimum tersebut selanjutnya difraksinasi menggunakan teknik ultrafiltrasi ≤ 3 kDa untuk mendapatkan fraksi peptida berukuran kecil (UP) yang juga diikuti dengan pengukuran konsentrasi protein terlarut pasca-penyaringan. Pada tahap akhir, data akumulasi protein terlarut, aktivitas antimikroba, serta aktivitas antioksidan dari ketiga fraksi (TP, HP, dan UP) dihimpun untuk kemudian dievaluasi dan dibandingkan secara statistik menggunakan analisis ANOVA.



Gambar 1 Diagram alir penelitian

2.3.1 Persiapan Sampel

Tahap persiapan sampel dilakukan berdasarkan metode Singh dan Deshpande (2018) yang telah dimodifikasi. Sampel yang digunakan berupa daging dada ayam IPB D1 yang diperoleh dari Pusat Pembibitan Ayam Lokal IPB D1, Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor. Ayam berumur empat bulan dengan bobot 1,3-1,4 kg digunakan sebagai sumber bahan. Pemrosesan daging dilakukan 24 jam setelah pembedahan (*postmortem*) untuk menjaga kestabilan protein dan mencegah terjadinya autolisis. Jaringan lemak subkutan dan jaringan ikat dihilangkan sehingga tersisa jaringan otot murni. Potongan daging kemudian dicuci dengan *aquades* dingin, dipotong kecil, dan dihomogenisasi menggunakan *chopper* hingga membentuk campuran yang

seragam. Homogenat disimpan dalam wadah tertutup pada suhu -20°C sampai digunakan pada tahap ekstraksi fraksi sarkoplasmik.

2.3.2 Ekstraksi Fraksi Sarkoplasmik (FS)

Ekstraksi fraksi sarkoplasmik dilakukan mengacu pada metode Singh dan Deshpande (2018) dengan beberapa modifikasi. Homogenat daging dada ayam IPB D1 dicampurkan dengan *buffer* fosfat 0,02 M pH 7,0 dengan perbandingan 1:10 (bv^{-1}). Proses homogenisasi diikuti dengan sentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm selama 45 menit pada suhu 4°C menggunakan sentrifugasi berpendingin. Supernatan yang diperoleh dari proses sentrifugasi sebagai fraksi protein sarkoplasmik yang larut air dipisahkan dari endapan yang merupakan fraksi miofibril tidak larut. Supernatan kemudian disaring menggunakan kertas saring *Whatman* 125 mm untuk menghilangkan sisa partikel padat. Filtrat jernih hasil penyaringan selanjutnya disimpan dalam wadah tertutup pada suhu -20°C hingga digunakan pada tahap hidrolisis enzimatik.

2.3.3 Hidrolisis Enzimatik Fraksi Sarkoplasmik Daging Dada Ayam

Proses hidrolisis fraksi sarkoplasmik (FS) daging ayam IPB D1 dilakukan dengan mengacu pada metode Setthaya *et al.* (2021) yang telah dimodifikasi sesuai karakteristik protein daging ayam IPB D1. Sampel FS dihidrolisis menggunakan enzim tripsin (*Sigma-Aldrich*) dengan aktivitas $1500 \text{ unit mg}^{-1}$ dalam *buffer* fosfat 0,02 M pH 7,0. Hidrolisis dilakukan pada tiga tingkat konsentrasi enzim, yaitu 0, 50, dan 100 unit, serta variasi waktu inkubasi 0, 6, dan 12 jam pada suhu 37°C untuk mengevaluasi pengaruh perlakuan terhadap pemecahan protein dan perubahan derajat hidrolisis (DH). Setiap kombinasi perlakuan dilakukan dalam tiga ulangan (U1, U2, dan U3). Proses inkubasi selesai, reaksi hidrolisis dihentikan melalui pemanasan pada suhu 100°C selama 15 menit guna menonaktifkan enzim tripsin dan mencegah hidrolisis berlanjut. Sampel kemudian didinginkan pada suhu ruang sebelum disimpan pada -20°C sampai digunakan untuk analisis berikutnya. Komposisi hidrolisis fraksi sarkoplasmik disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1 Komposisi hidrolisis fraksi sarkoplasmik (FS)

Enzim tripsin (U mL^{-1})	Komposisi (mL)	Waktu inkubasi		
		U1	U2	U3
0	Enzim	0	0	0
	Sampel	8,04	8,51	6,99
	Buffer	11,96	11,49	13,01
50	Enzim	0,67	0,67	0,67
	Sampel	8,04	8,51	6,99
	Buffer	11,29	10,82	12,35
100	Enzim	1,33	1,33	1,33
	Sampel	8,04	8,51	6,99
	Buffer	10,63	10,16	11,68

2.3.4 Derajat Hidrolisis (DH)

Penentuan derajat hidrolisis dilakukan menggunakan metode spektrofotometri *O-Phthaldialdehyde* (OPA) berdasarkan Nielsen *et al.* (2001). Tiga jenis larutan disiapkan untuk pengujian, yaitu blanko (air deionisasi), standar (*L-serine*), dan masing-masing tahapan perlakuan. Sebanyak 0,4 mL dari masing-masing larutan dimasukkan ke dalam *microtube*, kemudian ditambahkan 3 mL reagen OPA. Campuran diinkubasi selama dua menit pada suhu ruang untuk memastikan reaksi antara OPA dan gugus amino bebas berlangsung optimal. Absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 340 nm. Nilai absorbansi yang diperoleh selanjutnya digunakan untuk menentukan konsentrasi serine-NH₂, yang kemudian digunakan untuk menghitung jumlah ikatan terhidrolisis (H) dan derajat hidrolisis (DH) berdasarkan persamaan berikut.

$$\text{serine} - \text{NH}_2 = \frac{\text{OD}_{\text{sampel}} - \text{OD}_{\text{blank}}}{\text{OD}_{\text{standar}} - \text{OD}_{\text{blank}}} \times 0.9516 \times 0,1 \times \frac{100}{X \times P}$$

Keterangan:

Serine - NH ₂	= Standar protein dalam analisis
0,9516	= <i>Meqv serine</i> NH ₂ / g protein
OD	= Nilai absorbansi/ <i>optical density</i>
X	= Berat sampel (g)
P	= Persentase protein dalam sampel (%)
0,1	= Volume sampel (L)

$$H = \frac{(\text{serine NH}_2 - \beta)}{\alpha}$$

Keterangan:

H	= Ikatan terhidrolisis
Serine NH ₂	= <i>Meqv serine</i> NH ₂ g ⁻¹ protein
β	= Konstanta 0,40 untuk protein daging (Adler-Nissen 1986)
α	= Konstanta 1,00 untuk protein daging (Adler-Nissen 1986)

$$\text{DH} = \frac{H}{\text{htot}} \times 100\%$$

Keterangan:

DH	= Derajat hidrolisis
H	= <i>Meqv serine</i> NH ₂ / g protein
htot	= 7,6 (Adler-Nissen 1986)

2.3.5 Ultrafiltrasi Hidrolisat

Proses ultrafiltrasi hidrolisat dilakukan mengacu pada metode Kumar *et al.* (2023) dengan beberapa modifikasi. Fraksi sarkoplasmik (FS) dengan derajat hidrolisis (DH) tertinggi dipilih untuk tahap pemisahan peptida menggunakan membran ultrafiltrasi dengan *cut-off* ≤ 3 kDa (*Sartorius Vivaspin*). Sebanyak 13 mL hidrolisat dimasukkan ke dalam tabung ultrafiltrasi dan disentrifugasi pada kecepatan 6000 xg selama 45 menit pada suhu 4 °C menggunakan sentrifugasi berpendingin. Hasil filtrasi kemudian disimpan dalam suhu -20 °C untuk pengujian lebih lanjut.

2.3.6 Pengujian Konsentrasi Protein

Penentuan konsentrasi protein dilakukan dengan metode Lowry *et al.* (1951). Sebanyak 0,1 mL masing-masing sampel dari tahapan perlakuan dimasukkan ke dalam *microtube*, kemudian ditambahkan 0,1 mL larutan NaOH 2 N, dan dihomogenkan menggunakan *vortex mixer*. Campuran selanjutnya dipanaskan pada suhu 100 °C selama 10 menit menggunakan *heat block*, lalu didinginkan hingga mencapai suhu ruang. Sebanyak 1 mL larutan pereaksi yang terdiri atas Na₂CO₃ 2%, CuSO₄ 1%, dan NaK-tartrat 2% dengan perbandingan 100:1:1 (v:v:v) ditambahkan ke dalam campuran. Campuran dihomogenkan kembali dan dibiarkan bereaksi selama 10 menit pada suhu ruang. Tahap berikutnya dilakukan dengan penambahan 0,1 mL reagen Folin, kemudian campuran di *vortex*, dan diinkubasi selama 30 menit. Pengukuran absorbansi dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 550 nm. *Bovine Serum Albumin* (BSA) dengan konsentrasi bertingkat 0; 2,5; 5; 12,5; 25; 50; 125; 250; dan 500 µg mL⁻¹ digunakan sebagai larutan standar. Data absorbansi yang diperoleh digunakan untuk menghitung konsentrasi protein berdasarkan persamaan berikut.

$$\text{Konsentrasi (ppm)} = \left(\frac{\text{Abs Sampel}}{\text{Slope}} \right) \times \text{faktor pengenceran}$$

$$\text{Konsentrasi protein (mg mL}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Konsentrasi}}{1000}$$

2.3.7 Pengujian Antioksidan

Uji aktivitas antioksidan dilakukan menggunakan metode *1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl* (DPPH) untuk mengevaluasi kemampuan sampel dalam menangkap radikal bebas. Prosedur ini mengacu pada Parada *et al.* (2023) dengan beberapa penyesuaian. Seluruh sampel diseragamkan hingga memiliki konsentrasi protein sebesar 0,090 mg mL⁻¹. Sebanyak 0,15 mL sampel peptida dan larutan standar vitamin C masing-masing dicampurkan dengan 0,90 mL larutan DPPH 0,1 mM dalam metanol, dihomogenkan, dan dibiarkan bereaksi selama 30 menit dalam kondisi gelap. Absorbansi kemudian diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm. Vitamin C digunakan sebagai senyawa pembanding karena memiliki aktivitas antioksidan yang sangat tinggi dibanding vitamin A dan vitamin E (Lung dan Destiany 2017). Persentase aktivitas antioksidan (*scavenging activity*) dihitung berdasarkan penurunan intensitas warna DPPH menggunakan rumus berikut.

$$\text{Scavenging activity} = \frac{\text{Abs}_{\text{kontrol}} - \text{Abs}_{\text{sampel}}}{\text{Abs}_{\text{kontrol}}} \times 100$$

Keterangan:

Abs = Nilai absorbansi pada 517 nm

Persentase penghambatan yang diperoleh selanjutnya dikonversi menjadi kapasitas antioksidan dengan membandingkannya terhadap kurva standar hubungan konsentrasi vitamin C dan persentase penghambatan pada panjang gelombang yang sama. Nilai dari kurva standar tersebut menunjukkan kapasitas

antioksidan dalam satuan mg 100 mL⁻¹. Nilai ini kemudian diperhitungkan bersama bobot sampel untuk memperoleh nilai akhir kapasitas antioksidan. Hasil akhir dinyatakan sebagai mg ekuivalen vitamin C (mg EVC) per 100 g sampel, menggunakan rumus berikut.

$$\text{Kapasitas antioksidan} = \left(\frac{\text{Kapasitas AO kurva} / 100 \times 0,9 / 0,15 \times 10}{W} \right) \times 100$$

Keterangan:

Kapasitas AO kurva = Kapasitas antioksidan dalam kurva (mg 100 mL⁻¹)
W = Bobot sampel (mL)

2.3.8 Pengujian Antimikroba

Uji aktivitas antimikroba dilakukan menggunakan metode difusi cakram Kirby-Bauer yang mengacu pada prosedur Wijerathna *et al.* (2018) dengan beberapa modifikasi. Pengujian dilakukan terhadap empat bakteri uji yang terdiri atas dua gram-negatif (*Escherichia coli* dan *Salmonella typhi*) serta dua gram-positif (*Staphylococcus aureus* dan *Bacillus cereus*). Bakteri uji diinokulasi ke media *nutrient agar* (NA) menggunakan teknik *streak plate* dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam.

Sebanyak 15-20 mL media *mueller hinton agar* (MHA) steril terlebih dahulu dituangkan ke dalam cawan petri, kemudian ditambahkan 1 mL bakteri uji. Campuran tersebut dihomogenkan secara perlahan dengan cara menggerakkan cawan petri membentuk pola angka delapan hingga merata, kemudian dibiarkan memadat pada suhu ruang. Seluruh sampel diseragamkan sebelum pengujian hingga memiliki konsentrasi protein sebesar 0,090 mg mL⁻¹. Kertas cakram steril ditetesi sebanyak 20 µL pada masing-masing tahapan perlakuan, yaitu sampel fraksi sarkoplasmik daging ayam sebelum hidrolisis, setelah proses hidrolisis enzimatis menggunakan enzim tripsin, dan hasil ultrafiltrasi ≤ 3 kDa. *Amoxicillin* 50 mg mL⁻¹ digunakan sebagai kontrol positif.

Seluruh kertas cakram diletakkan pada permukaan media, kemudian cawan petri dilapisi kertas saring, ditutup, dan dibungkus menggunakan *plastic wrap*. Selanjutnya, cawan disimpan dalam refrigerator selama 1,5 jam untuk memungkinkan terjadinya difusi awal, sebelum diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Zona hambat yang terbentuk setelah inkubasi diukur menggunakan jangka sorong digital dan dinyatakan dalam milimeter (mm). Diameter zona hambat diperoleh dari hasil pengukuran diameter total zona bening yang dikurangi dengan diameter kertas cakram (*paper disc*) sebesar 6 mm. Sampel yang tidak menghasilkan zona hambat dianggap tidak memiliki aktivitas antimikroba.

2.4 Rancangan Percobaan dan Analisis Data

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) pola faktorial dua arah. Pola faktorial dua arah digunakan untuk pengamatan derajat hidrolisis dengan faktor pertama berupa taraf jumlah penambahan enzim tripsin 0, 50, dan 100 unit (i), faktor kedua berupa waktu inkubasi 0, 6, dan 12 jam (j), dan setiap kombinasi perlakuan diulang sebanyak 3 kali (k). Model statistik yang digunakan berdasarkan Steel dan Torrie (1997) sebagai berikut:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Keterangan:

- Y_{ijk} = Respon penelitian pada satuan percobaan ke - k yang memperoleh kombinasi perlakuan ke - i dan taraf ke - j
 μ = Rataan umum respon penelitian
 α_i = Pengaruh perlakuan taraf penambahan enzim tripsin ke - i
 β_j = Pengaruh waktu inkubasi ke - j
 $(\alpha\beta)_{ij}$ = Pengaruh interaksi perlakuan ke - i dan taraf ke - j
 ε_{ijk} = Pengaruh galat perlakuan ke - i dan taraf ke - j pada ulangan ke - k

Rancangan acak lengkap (RAL) pola searah dengan tiga perlakuan (i), yaitu fraksi sarkoplasmik ayam IPB D1 tanpa hidrolisis (TP), fraksi sarkoplasmik hasil hidrolisis optimum dengan enzim tripsin (HP), dan filtrat fraksi sarkoplasmik ≤ 3 kDa dari hasil hidrolisis optimum dengan enzim tripsin (UP). Setiap perlakuan pada fraksi sarkoplasmik daging ayam IPB D1 diulang sebanyak tiga kali (j). Peubah yang diamati meliputi aktivitas antioksidan dan aktivitas antimikroba. Model statistik yang digunakan mengacu pada Steel dan Torrie (1991) sebagai berikut:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}$$

Keterangan:

- Y_{ij} = Respon penelitian akibat perlakuan ke - i pada ulangan ke - j
 μ = Rataan umum respons penelitian
 α_i = Pengaruh aditif dari perlakuan ke - i
 ε_{ij} = Pengaruh galat pada perlakuan ke - i dan ulangan ke j

Data konsentrasi protein, aktivitas antioksidan, dan antimikroba dianalisis menggunakan analisis ragam (ANOVA), dan apabila perlakuan menunjukkan pengaruh nyata atau sangat nyata, maka pengujian dilanjutkan dengan uji lanjut Tukey.

III HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Derajat Hidrolisis (DH)

Penentuan derajat hidrolisis (DH) pada penelitian ini dilakukan menggunakan metode o-phthaldialdehyde (OPA), yang didasarkan pada reaksi antara reagen OPA dengan gugus amino primer sehingga membentuk senyawa berwarna yang dapat diukur secara spektrofotometri (Nielsen *et al.* 2001). Absorbansi yang terukur sebanding dengan jumlah gugus amino bebas yang terbentuk, sehingga dapat mencerminkan tingkat pemutusan ikatan peptida selama proses hidrolisis berlangsung. Derajat hidrolisis didefinisikan sebagai persentase ikatan peptida yang terputus selama proses hidrolisis protein (Adler-Nissen 1979). Dengan demikian, semakin tinggi jumlah gugus amino bebas yang terbentuk, semakin tinggi pula nilai DH yang dihasilkan. Nilai derajat hidrolisis pada fraksi sarkoplasmik daging ayam yang dihidrolisis menggunakan enzim tripsin dengan variasi konsentrasi dan waktu inkubasi disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2 Nilai derajat hidrolisis pada fraksi sarkoplasmik daging ayam IPB D1 yang dihidrolisis menggunakan enzim tripsin

Enzim tripsin (U mL ⁻¹)	Derajat hidrolisis (%)		
	0 jam	6 jam	12 jam
0	9,07 ± 0,91 ^D	9,16 ± 0,18 ^D	10,17 ± 0,66 ^D
50	9,68 ± 1,00 ^D	13,89 ± 1,53 ^C	22,53 ± 0,53 ^A
100	10,22 ± 0,98 ^D	21,15 ± 0,22 ^A	16,80 ± 0,13 ^B

Keterangan: nilai yang diikuti huruf superskrip yang berbeda menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($p < 0,01$).

Hasil hidrolisis fraksi sarkoplasmik daging ayam IPB D1 menggunakan enzim tripsin menunjukkan bahwa nilai derajat hidrolisis (DH) dipengaruhi oleh konsentrasi enzim dan waktu inkubasi. Berdasarkan Tabel 2, nilai DH tertinggi diperoleh pada perlakuan konsentrasi tripsin 50 U mL⁻¹ dengan waktu inkubasi 12 jam, yaitu sebesar 22,53 ± 0,53%, yang berbeda sangat nyata ($p < 0,01$) dibandingkan perlakuan lainnya. Nilai DH dipengaruhi oleh jenis enzim, konsentrasi enzim, suhu, pH, serta waktu hidrolisis (Restiani 2016).

Peningkatan DH hingga 12 jam pada konsentrasi 50 U mL⁻¹ menunjukkan bahwa pada kondisi tersebut proses hidrolisis protein sarkoplasmik berlangsung lebih efektif. Hal ini sejalan dengan yang dilaporkan oleh Noman *et al.* (2018) bahwa DH cenderung meningkat seiring bertambahnya waktu inkubasi, yang disebabkan oleh semakin lamanya kontak antara enzim dan substrat. Pada penelitian ini, pola tersebut tercermin dari peningkatan DH secara konsisten dari 9,68% pada 0 jam menjadi 13,89% pada 6 jam, dan mencapai 22,53% pada 12 jam untuk konsentrasi 50 U mL⁻¹. Peningkatan konsentrasi enzim dapat mempercepat laju reaksi hidrolisis (Putri dan Denny 2025), namun efektivitasnya tetap bergantung pada ketersediaan substrat dalam sistem (Salwanee *et al.* 2013). Oleh karena itu, pada konsentrasi 50 U mL⁻¹ dan waktu inkubasi 12 jam, kondisi reaksi diduga berada pada titik optimum, di mana waktu inkubasi yang cukup memungkinkan hidrolisis berlangsung maksimal, sementara konsentrasi enzim

masih seimbang dengan jumlah substrat sehingga interaksi enzim-substrat berlangsung secara efisien.

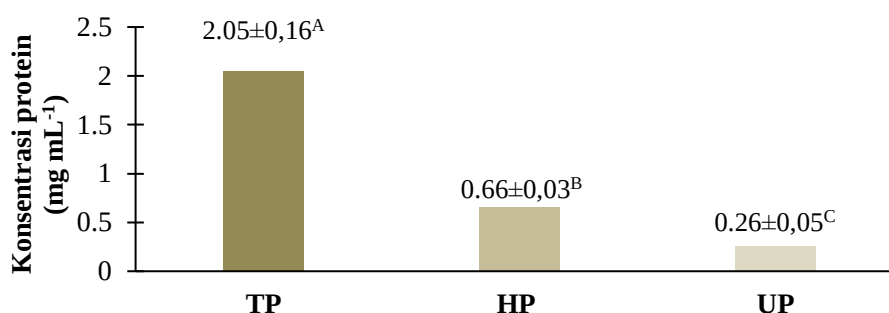
Kinerja optimal tripsin juga didukung oleh sifatnya sebagai enzim proteolitik serin yang memiliki stabilitas termal hingga 50 °C serta mampu bekerja pada rentang pH yang luas (6,0-11,0), termasuk pada pH 7 yang digunakan dalam penelitian ini (Klomklao *et al.* 2007). Kondisi tersebut memungkinkan tripsin tetap mempertahankan aktivitas proteolitiknya dalam menghidrolisis protein sarkoplasmik secara efektif. Namun demikian, pada konsentrasi yang lebih tinggi (100 U mL⁻¹), nilai DH pada waktu inkubasi 12 jam justru lebih rendah dibandingkan konsentrasi 50 U mL⁻¹, yaitu sebesar 16,80 ± 0,13%, meskipun pada waktu inkubasi 6 jam konsentrasi 100 U mL⁻¹ menghasilkan DH yang cukup tinggi sebesar 21,15 ± 0,22%. Penurunan nilai DH dari waktu inkubasi 6 jam ke 12 jam pada konsentrasi 100 U mL⁻¹ ini menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi enzim tidak selalu berbanding lurus dengan peningkatan derajat hidrolisis. Menurut Putri dan Denny (2025), peningkatan konsentrasi enzim hanya akan meningkatkan laju reaksi hingga mencapai kondisi optimum tertentu, dan setelah titik tersebut efektivitas reaksi dapat menurun. Hal ini juga didukung oleh Noman *et al.* (2018) yang menyatakan bahwa konsentrasi enzim yang terlalu tinggi menyebabkan agregasi enzim yang menghambat difusi substrat sehingga laju reaksi menjadi jenuh.

Selain itu, keterbatasan substrat dalam sistem dapat menyebabkan enzim yang berlebih tidak berkontribusi secara efektif dalam proses hidrolisis (Salwanee *et al.* 2013). Pada waktu inkubasi 12 jam dengan konsentrasi enzim tinggi, akumulasi produk hidrolisis berupa peptida diduga telah cukup tinggi sehingga dapat menghambat aktivitas enzim. Fenomena ini dikenal sebagai inhibisi produk, di mana peptida hasil hidrolisis dapat berinteraksi dengan sisi aktif enzim dan menurunkan aktivitas katalitiknya (Adler-Nissen 1979; Kristinsson dan Rasco 2000). Konsentrasi enzim yang digunakan lebih tinggi, efisiensi hidrolisis justru menurun pada waktu inkubasi 12 jam, sehingga nilai DH yang dihasilkan lebih rendah dibandingkan kondisi optimum pada konsentrasi 50 U mL⁻¹.

3.2 Konsentrasi Protein

Uji konsentrasi protein dilakukan untuk menentukan konsentrasi protein yang terkandung dalam suatu bahan pangan (Hayes 2020). Penentuan konsentrasi protein pada fraksi sarkoplasmik daging ayam IPB D1 dalam penelitian ini dilakukan menggunakan metode Lowry. Metode ini didasarkan pada reaksi antara ikatan peptida protein dengan *reagen Folin-Ciocalteu* yang menghasilkan kompleks berwarna biru yang dapat diukur dengan spektrofotometri (Arunima dan Verulkar 2022). Nilai konsentrasi protein yang diperoleh juga digunakan sebagai dasar penentuan rasio enzim terhadap substrat dalam proses hidrolisis enzimatik.

Berdasarkan data pada Gambar 2, nilai konsentrasi protein pada fraksi sarkoplasmik sebelum hidrolisis (TP) dalam penelitian ini adalah 2,05 mg mL⁻¹. Nilai tersebut relatif lebih rendah dibandingkan dengan fraksi sarkoplasmik hasil penelitian Alifiya (2024) yang berkisar antara 2,22-2,49 mg mL⁻¹. Perbedaan nilai konsentrasi protein TP yang diperoleh pada penelitian ini dibandingkan dengan Alifiya (2024) diduga berkaitan dengan adanya perbedaan karakteristik sampel maupun kondisi penelitian yang digunakan, sehingga memengaruhi nilai konsentrasi protein yang terukur.



Gambar 2 Perbandingan konsentrasi protein pada fraksi sarkoplasmik ayam IPB D1

Keterangan: TP: fraksi sarkoplasmik ayam IPB D1 tanpa hidrolisis, HP: fraksi sarkoplasmik hasil hidrolisis optimum dengan enzim tripsin, UP: filtrat fraksi sarkoplasmik ≤ 3 kDa dari hasil hidrolisis optimum dengan enzim tripsin, nilai yang diikuti huruf superskrip yang berbeda menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($p < 0,01$).

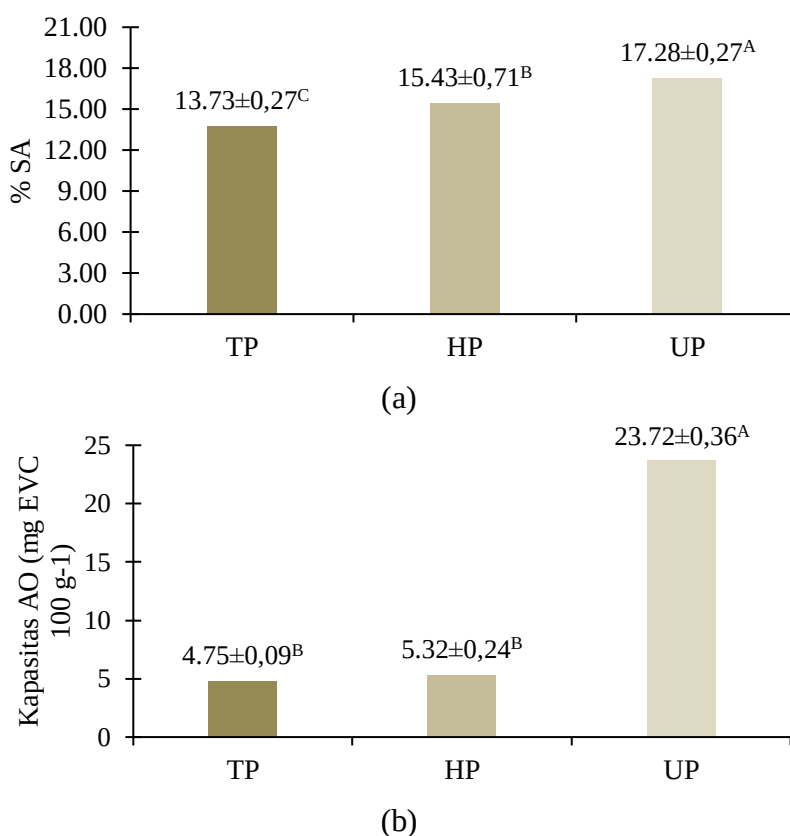
Penurunan konsentrasi protein yang signifikan dari TP ($2,05 \text{ mg mL}^{-1}$) menjadi HP ($0,66 \text{ mg mL}^{-1}$) merupakan konsekuensi langsung dari proses hidrolisis enzimatis menggunakan enzim tripsin. Hidrolisis enzimatis menyebabkan degradasi protein menjadi polipeptida dan peptida berukuran lebih kecil akibat pemutusan ikatan peptida oleh enzim proteolitik (Vorob'ev 2022). Protein terdegradasi menjadi fragmen peptida yang lebih sederhana akibat aktivitas spesifik tripsin dalam memutus ikatan peptida pada residu lisin dan arginin selama proses hidrolisis. Perubahan struktural ini memengaruhi hasil pengukuran menggunakan metode Lowry yang bekerja melalui dua tahap reaksi, yaitu reaksi biuret antara ion Cu^{2+} dengan ikatan peptida dalam suasana basa yang menghasilkan kompleks Cu^{1+} , diikuti oleh reduksi reagen Folin-Ciocalteu oleh Cu^{1+} dan residu aromatik terutama tirosin dan triptofan (Noble dan Bailey 2009). Berkurangnya panjang rantai peptida akibat hidrolisis menyebabkan jumlah ikatan peptida dan kandungan residu aromatik per unit protein menjadi lebih sedikit, sehingga kedua tahap reaksi tersebut berlangsung kurang optimal dan nilai protein yang terdeteksi lebih rendah (Peterson (1979). Penurunan konsentrasi protein pada HP tidak menunjukkan hilangnya protein, melainkan perubahan bentuk protein menjadi peptida dengan keterbatasan deteksi oleh metode yang digunakan.

Penurunan konsentrasi protein berlanjut dari HP ($0,66 \text{ mg mL}^{-1}$) menjadi UP ($0,26 \text{ mg mL}^{-1}$) setelah proses ultrafiltrasi menggunakan membran ≤ 3 kDa. Pada tahap ini, penurunan tidak lagi disebabkan oleh perubahan struktur protein, melainkan oleh pemisahan berdasarkan ukuran molekul, di mana hanya peptida dengan bobot molekul rendah yang lolos sebagai permeat (Fellows 2022). Akibatnya, fraksi UP didominasi oleh peptida berukuran sangat kecil. Dominasi peptida berukuran kecil (< 3 kDa) pada fraksi ini menyebabkan nilai protein yang terukur menjadi lebih rendah, karena peptida dengan ukuran tersebut diketahui memberikan respons yang lebih lemah terhadap metode Lowry dibandingkan protein utuh atau peptida dengan rantai yang lebih panjang. Meskipun demikian, peptida berbobot molekul rendah pada fraksi UP diketahui memiliki berbagai aktivitas fungsional seperti antioksidan, antihipertensi, dan imunomodulator (Aneiros dan Garateix 2004), serta memiliki tingkat absorpsi yang lebih tinggi dalam sistem pencernaan sehingga berpotensi meningkatkan pencernaan protein

(Chalamaiah *et al.* 2012). Penurunan konsentrasi secara kuantitatif, proses ultrafiltrasi berkontribusi dalam meningkatkan kualitas protein secara fungsional.

3.3 Aktivitas Antioksidan

Antioksidan merupakan senyawa yang mampu menghambat kerusakan oksidatif dengan menetralkan radikal bebas melalui donasi elektron, sehingga mengurangi kerusakan komponen seluler. Ketidakseimbangan antara radikal bebas dan sistem antioksidan dapat menyebabkan stres oksidatif yang berkontribusi terhadap penyakit degeneratif (Lobo *et al.* 2010). Aktivitas antioksidan umumnya diuji menggunakan metode DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), yang mengukur kemampuan senyawa dalam mereduksi radikal bebas melalui transfer elektron atau atom hidrogen. Reaksi ini ditandai dengan perubahan warna dari ungu menjadi kuning yang diamati pada panjang gelombang 517 nm (Brand-Williams *et al.* 1995). Metode DPPH banyak digunakan karena sederhana, cepat, dan ekonomis serta efektif untuk mengevaluasi kemampuan penangkapan radikal bebas pada berbagai sampel biologis (Kedare dan Singh 2011).



Gambar 3 Aktivitas antioksidan daging ayam IPB D1. (a) persentase *scavenging activity*, (b) kapasitas antioksidan (mg EVC 100 g⁻¹)

Keterangan: TP: Fraksi sarkoplasmik ayam IPB D1 tanpa hidrolisis, HP: Fraksi sarkoplasmik hasil hidrolisis optimum dengan enzim tripsin, UP: Filtrat fraksi sarkoplasmik ≤ 3 kDa dari hasil hidrolisis optimum dengan enzim tripsin. Nilai yang diikuti huruf superskrip yang berbeda menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($p < 0,01$).

Peptida hasil hidrolisis umumnya menunjukkan aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan protein utuh karena ukuran molekul, komposisi, dan urutan asam amino yang lebih mendukung interaksi dengan radikal bebas (Elias *et al.* 2008; Mundi dan Aluko 2014). Berdasarkan data pada gambar 3, seluruh fraksi sarkoplasmik (TP, HP, dan UP) menunjukkan aktivitas antioksidan yang terdeteksi melalui peubah persentase *scavenging activity* (% SA) dan kapasitas antioksidan (mg EVC 100 g⁻¹), dengan peningkatan yang konsisten seiring perlakuan hidrolisis dan ultrafiltrasi.

Fraksi TP menunjukkan aktivitas antioksidan awal dengan nilai % SA sebesar $13,73 \pm 0,27\%$ dan kapasitas antioksidan sebesar $4,75 \pm 0,09$ mg EVC 100 g⁻¹. Aktivitas ini diduga berasal dari residu aromatik triptofan (8,77%) dan tirosin (5,34%) yang berperan dalam donor elektron kepada radikal DPPH melalui stabilisasi resonansi, serta lisin (8,64%) dan arginin (5,21%) yang berkontribusi melalui mekanisme transfer proton (Elias *et al.* 2008; Alifiya 2024). Namun demikian, dalam kondisi protein utuh (*intact protein*), sebagian besar residu aktif tersebut masih terkubur (*buried*) di dalam struktur tiga dimensi protein (Elias *et al.* 2008). Akibatnya, aksesibilitas residu tersebut terhadap molekul radikal DPPH menjadi terbatas, yang kemudian menjadi faktor utama rendahnya aktivitas penangkalan radikal bebas pada fraksi ini.

Fraksi HP menunjukkan peningkatan aktivitas antioksidan dengan nilai % SA sebesar $15,43 \pm 0,71\%$ dan kapasitas antioksidan sebesar $5,32 \pm 0,24$ mg EVC 100 g⁻¹. Peningkatan ini terjadi karena tripsin memutus ikatan peptida pada sisi karboksil residu lisin dan arginin sehingga menghasilkan peptida berukuran lebih kecil dan lebih fleksibel (Magfirah *et al.* 2022). Hidrolisis tersebut meningkatkan keterpaparan residu asam amino yang berperan dalam aktivitas antioksidan sehingga interaksinya dengan radikal DPPH menjadi lebih efektif. Namun, aktivitas yang dihasilkan masih relatif terbatas karena hidrolisat yang terbentuk masih terdiri atas campuran peptida dengan bobot molekul, komposisi, dan urutan asam amino yang beragam. Faktor-faktor tersebut diketahui berperan penting dalam menentukan aktivitas antioksidan peptida (Xu *et al.* 2024).

Aktivitas antioksidan tertinggi diperoleh pada fraksi UP (≤ 3 kDa) dengan nilai % SA sebesar $17,28 \pm 0,27\%$ dan kapasitas antioksidan sebesar $23,72 \pm 0,36$ mg EVC 100 g⁻¹. Proses ultrafiltrasi mampu memisahkan peptida berdasarkan ukuran dan menghasilkan fraksi yang didominasi peptida berbobot molekul rendah. Fraksi ini diduga mengandung asam amino hidrofobik, aromatik, dan yang mengandung gugus sulfur yang berperan dalam mekanisme donor hidrogen maupun transfer elektron, sehingga penangkapan radikal DPPH dapat berlangsung lebih efektif (Zou *et al.* 2016). Selain itu, proses ultrafiltrasi menyebabkan molekul protein atau peptida berukuran besar tertahan pada membran, sehingga diperoleh fraksi peptida dengan tingkat kemurnian yang lebih tinggi. Kondisi ini meningkatkan proporsi peptida yang memiliki aktivitas antioksidan dalam sistem, sehingga aktivitas penangkapan radikal bebas menjadi lebih tinggi (Kusumaningtyas *et al.* 2015). Hasil ini sejalan dengan penelitian Seutia (2024) dan Qorina (2024) yang juga melaporkan peningkatan aktivitas antioksidan pada fraksi ultrafiltrasi sarkoplasmik ≤ 3 kDa. Nilai aktivitas antioksidan yang diperoleh lebih rendah dibandingkan penelitian Seutia (2024), yang diduga berkaitan dengan perbedaan spesifisitas enzim. Kimotripsin menghasilkan peptida yang lebih kaya residu aromatik seperti fenilalanin, triptofan, dan tirosin yang berperan penting

dalam mekanisme penangkapan radikal DPPH, sedangkan tripsin memutus ikatan pada residu lisin dan arginin sehingga aktivitas antioksidan yang dihasilkan cenderung lebih rendah (Elias *et al.* 2008).

Perbedaan pola peningkatan antara % SA dan kapasitas antioksidan menunjukkan bahwa kedua peubah mengukur aspek yang berbeda. Nilai % SA menggambarkan persentase penghambatan radikal DPPH dalam sistem, sedangkan kapasitas antioksidan yang dinyatakan sebagai mg EVC 100 g⁻¹ lebih sensitif dalam menunjukkan kualitas aktivitas antioksidan antar fraksi (Huang *et al.* 2005; Abeyrathne *et al.* 2022). Secara keseluruhan, kombinasi hidrolisis enzimatis dan ultrafiltrasi terbukti efektif meningkatkan aktivitas antioksidan peptida sarkoplasmik daging ayam IPB D1.

3.4 Aktivitas Antimikroba

Pengujian aktivitas antimikroba dilakukan untuk mengevaluasi kemampuan fraksi sarkoplasmik ayam IPB D1 dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen pangan sebelum dan setelah hidrolisis enzimatis serta ultrafiltrasi. Bakteri uji yang digunakan terdiri atas bakteri gram-positif (*Bacillus cereus* dan *Staphylococcus aureus*) serta bakteri gram-negatif (*Escherichia coli* dan *Salmonella typhi*), yang dipilih karena perannya sebagai patogen pangan utama penyebab *foodborne disease* yang erat kaitannya dengan kontaminasi produk pangan asal hewan (Bennett *et al.* 2013; Newell *et al.* 2010). Penggunaan kedua kelompok bakteri ini juga bertujuan untuk mengevaluasi spektrum aktivitas antimikroba secara lebih komprehensif, mencakup bakteri dengan struktur dinding sel yang berbeda.

Tabel 3 Aktivitas antimikroba fraksi sarkoplasmik ayam IPB D1

Jenis bakteri	Diameter zona bening (mm)			
	TP	HP	UP	<i>Amoxicillin</i>
<i>Bacillus cereus</i> (+)	1,48 ± 0,21 ^C	1,92 ± 0,20 ^{BC}	2,12 ± 0,22 ^B	10,38 ± 0,99 ^A
<i>Staphylococcus aureus</i> (+)	1,62 ± 0,28 ^C	2,07 ± 0,21 ^{BC}	2,27 ± 0,21 ^B	10,50 ± 0,29 ^A
<i>Escherichia coli</i> (-)	0,98 ± 0,20 ^C	1,45 ± 0,29 ^{BC}	1,73 ± 0,28 ^B	9,22 ± 0,11 ^A
<i>Salmonella typhi</i> (-)	1,11 ± 0,15 ^C	1,69 ± 0,16 ^{BC}	2,03 ± 0,19 ^B	9,50 ± 0,30 ^A

Keterangan: TP: Fraksi sarkoplasmik ayam IPB D1 tanpa hidrolisis, HP: Fraksi sarkoplasmik hasil hidrolisis optimum dengan enzim tripsin, UP: Filtrat fraksi sarkoplasmik ≤ 3 kDa dari hasil hidrolisis optimum dengan enzim tripsin, *Amoxicillin*: kontrol positif. Nilai yang diikuti huruf superskrip yang berbeda menunjukkan perbedaan yang sangat nyata (p < 0,01) antar baris.

Berdasarkan Tabel 3, kontrol positif (*Amoxicillin*) menunjukkan diameter zona bening tertinggi terhadap seluruh bakteri uji, yaitu berkisar 9,22-10,50 mm. Nilai ini menunjukkan bahwa *amoxicillin* memiliki efektivitas antimikroba yang jauh lebih tinggi karena bekerja secara spesifik menghambat sintesis dinding sel bakteri. *Amoxicillin* merupakan antibiotik β-laktam yang bersifat bakterisidal dan memiliki spektrum aktivitas luas terhadap berbagai bakteri gram-positif dan gram-

negatif, termasuk *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi*. Mekanisme kerjanya melibatkan pengikatan pada *penicillin-binding proteins* (PBPs) yang menghambat proses transpeptidasi dalam sintesis dinding sel bakteri, sehingga menyebabkan lisis dinding sel dan kematian bakteri (Akhavan *et al.* 2023). Sebaliknya, sampel tahap TP, HP, dan UP menghasilkan zona hambat yang relatif kecil, yaitu sekitar 0,98-2,27 mm, sehingga aktivitas antimikroba tergolong lemah berdasarkan diameter zona hambat yang dihasilkan

Seluruh perlakuan berbasis fraksi sarkoplasmik mampu menghasilkan zona bening pada bakteri gram-negatif (*Escherichia coli* dan *Salmonella typhi*) maupun gram-positif (*Staphylococcus aureus* dan *Bacillus cereus*), yang menunjukkan adanya aktivitas antimikroba alami dari protein maupun peptida yang terkandung di dalamnya. Perbedaan struktur dinding sel antara kedua kelompok bakteri ini turut menentukan tingkat kerentanan masing-masing. Pada bakteri gram-positif, lapisan peptidoglikan yang tebal umumnya tidak menghalangi penetrasi peptida antimikroba, meskipun kandungan asam teikoat dan lipoteikoat bermuatan negatif dapat berperan ganda sebagai jalur menuju membran sitoplasma sekaligus sebagai penangkap peptida, sehingga bakteri jenis ini relatif lebih rentan terhadap peptida kationik karena tidak memiliki membran luar sebagai penghalang fisik tambahan (Malanovic dan Lohner 2016). Sebaliknya, pada bakteri gram-negatif, membran luar yang kaya LPS berfungsi sebagai penghalang utama yang membatasi penetrasi peptida, sehingga peptida harus terlebih dahulu mendestabilisasi membran luar sebelum mencapai membran sitoplasma (Clifton *et al.* 2015).

Kemampuan fraksi sarkoplasmik menghambat kedua kelompok bakteri tersebut berkaitan erat dengan komposisi asam aminonya. Mengacu pada penelitian Alifiya (2024), fraksi sarkoplasmik ayam IPB D1 mengandung asam amino kationik seperti lisin (8,64%), arginin (5,21%), dan histidin (2,99%), serta asam amino hidrofobik seperti triptofan (8,77%) dan alanin (5,56%). Keberadaan asam amino kationik berperan penting dalam tahap awal mekanisme kerja melalui interaksi elektrostatik dengan komponen bermuatan negatif pada permukaan sel bakteri, seperti LTA pada bakteri gram-positif dan LPS pada bakteri gram-negatif. Sifat amfipatik peptida kemudian memperkuat perlekatan ini, memfasilitasi insersi awal ke dalam membran sebelum terjadinya disrupsi (Hajigha *et al.* 2024). Aloanis dan Paat (2025) menyatakan bahwa setelah berikatan dengan membran, peptida antimikroba dapat mengganggu integritas *bilayer lipid* melalui berbagai mekanisme, antara lain pembentukan pori maupun disrupsi membran secara menyeluruh, yang pada akhirnya meningkatkan permeabilitas membran sehingga ion dan molekul intraseluler bocor keluar sel dan menyebabkan kematian bakteri.

Selain itu, residu asam amino hidrofobik seperti triptofan, fenilalanin, dan alanin meningkatkan kemampuan peptida untuk berpartisipasi dalam interaksi hidrofobik dengan inti *lipid bilayer*, sehingga memperkuat proses penetrasi membran dan meningkatkan efisiensi disrupsi struktur membran bakteri. Kombinasi sifat kationik dan hidrofobik ini menjadi faktor utama yang menentukan spektrum dan efektivitas aktivitas antimikroba peptida (Mojsoska dan Jenssen 2015). Efektivitas mekanisme-mekanisme tersebut sangat bergantung pada ketersediaan peptida bioaktif dalam bentuk bebas yang dapat berinteraksi langsung dengan membran bakteri. Pada tahap TP, zona hambat yang terbentuk merupakan yang terendah pada hampir seluruh bakteri uji, yaitu berkisar 0,98-1,69 mm, yang diduga karena sebagian besar protein masih berada dalam bentuk utuh sehingga

peptida bioaktif masih terikat dalam struktur protein induknya dan belum dapat bekerja secara optimal. Peptida bioaktif tersebut umumnya berada dalam keadaan tidak aktif dan baru dapat dilepaskan melalui proses hidrolisis enzimatis (Rahayu dan Utami 2026).

Tahap HP terjadi peningkatan diameter zona hambat pada seluruh bakteri uji dibandingkan tahap TP. Peningkatan ini menunjukkan bahwa hidrolisis tidak hanya memotong rantai protein, tetapi juga melepaskan peptida bioaktif yang sebelumnya masih terikat dalam struktur protein induknya (Rahayu dan Utami 2026). Hal ini berkaitan dengan spesifisitas tripsin yang memotong pada sisi karboksil residu lisin dan arginin (Magfirah *et al.* 2022), sehingga hidrolisis fraksi sarkoplasmik pada penelitian ini diduga menghasilkan pola peptida yang mencerminkan karakteristik pemotongan enzim tersebut. Pemotongan ini meningkatkan ketersediaan residu bermuatan positif serta mengekspos gugus hidrofobik yang sebelumnya tersembunyi dalam struktur protein, sehingga memperkuat interaksi peptida dengan membran bakteri dan meningkatkan efektivitas aktivitas antimikroba.

Aktivitas antimikroba semakin meningkat setelah dilakukan ultrafiltrasi menghasilkan fraksi UP (≤ 3 kDa). Mekanisme kerja peptida antimikroba berukuran kecil dilaporkan melibatkan gangguan terhadap integritas membran sel bakteri, sehingga meningkatkan permeabilitas dan menyebabkan kebocoran komponen intraseluler (Wang *et al.* 2016). Hal ini sejalan dengan penelitian Seutia (2025) yang melaporkan bahwa fraksi hidrolisat protein sarkoplasmik ayam IPB D1 menggunakan enzim kimotripsin dengan berat molekul ≤ 3 kDa menunjukkan peningkatan aktivitas antioksidan dan antibakteri, terutama terhadap bakteri gram-negatif.

@rahayu@ipb.ac.id



IV SIMPULAN DAN SARAN

4.1 Simpulan

Hidrolisis enzimatik fraksi sarkoplasmik daging ayam IPB D1 menggunakan enzim tripsin mencapai kondisi optimum pada kombinasi konsentrasi enzim 50 U mL⁻¹ dan waktu inkubasi 12 jam berdasarkan nilai derajat hidrolisisnya. Selanjutnya, fraksi ultrafiltrasi berukuran ≤ 3 kDa (UP) menghasilkan aktivitas penghambatan radikal bebas dan kapasitas antioksidan tertinggi dibandingkan dengan fraksi tanpa hidrolisis (TP) dan hidrolisat optimum (HP). Fraksi ultrafiltrasi berukuran ≤ 3 kDa (UP) tersebut juga menunjukkan daya hambat antimikroba paling kuat terhadap seluruh bakteri uji (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, dan *Salmonella typhi*) dibandingkan dengan fraksi TP dan HP.

4.2 Saran

Penelitian selanjutnya disarankan untuk melakukan karakterisasi lebih lanjut terhadap peptida bioaktif yang dihasilkan, khususnya pada fraksi berukuran ≤ 3 kDa yang menunjukkan aktivitas tertinggi, guna memperoleh informasi yang lebih rinci terkait distribusi ukuran molekul dan sifat kimia peptida. Selain itu, pemisahan lanjutan terhadap peptida berdasarkan sifat fisikokimia, seperti muatan, perlu dilakukan untuk mengidentifikasi fraksi peptida yang lebih spesifik berperan dalam aktivitas antioksidan dan antimikroba. Pengembangan metode pemisahan dan karakterisasi yang lebih lanjut diharapkan dapat memberikan pemahaman yang lebih mendalam mengenai hubungan antara struktur peptida dan aktivitas bioaktifnya.



DAFTAR PUSTAKA

- Abeyrathne EDNS, Nam K, Huang X, Ahn DU. 2022. Plant-and animal-based antioxidants' structure, efficacy, mechanisms, and applications: A review. *Antioxidants*. 11(5):1025.
- Adler-Nissen J. 1979. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *J Agric Food Chem*. 27(6):1256–1262. doi:10.1021/jf60226a042.
- Adler-Nissen J. 1986. *Enzymic Hydrolysis of Food Proteins*. London: Elsevier Applied Science Publishers. 427.
- Akbarian M, Khani A, Eghbalpour S, Uversky VN. 2022. Bioactive peptides: Synthesis, sources, applications, and proposed mechanisms of action. *Int J Mol Sci*. 23(3):1445.
- Akhavan BJ, Khanna NR, Vijhni P. 2023. Amoxicillin. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island: StatPearls Publishing.
- Al Habib MF, Murtini S, Cyrilla L, Arief II, Mutia R, Sumantri C. 2020. Performa pertumbuhan ayam IPB-D1 pada perlakuan pakan dan manajemen pemeliharaan yang berbeda. *J Agripet*. 20(2).
- Alifiya Q. 2024. Aktivitas antioksidan dan antibakteri hidrolisat daging ayam lokal IPB D1 dengan proteinase k [skripsi]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Aloanis AA, Paat VI. 2025. *Peptida antimikroba*. Penerbit Tahta Media.
- Aneiros A, Garateix A. 2004. Bioactive peptides from marine sources: Pharmacological properties and isolation procedures. *J Chromatogr B*. 803(1):41-53.
- Arunima S, Verulkar S. 2022. Comparative analysis of different protein estimation methods. *Pharma Innov J*. 11(4S):2091-2095.
- Awosika T, Aluko RE. 2019. Enzymatic pea protein hydrolysates are active trypsin and chymotrypsin inhibitors. *Foods*. 8(6):200.
- Bennett SD, Walsh KA, Gould LH. 2013. Foodborne disease outbreaks caused by *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, and *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis*. 57(3):425-433.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset CLWT. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT Food Sci Technol*. 28(1):25-30.
- Chalamaiah M, Hemalatha R, Jyothirmayi T. 2012. Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications. *Food Chem*. 135(4):3020-3038.
- Clifton LA, Skoda MW, Le Brun AP, Ciesielski F, Kuzmenko I, Holt SA, Lakey JH. 2015. Effect of divalent cation removal on the structure of gram-negative bacterial outer membrane models. *Langmuir*. 31(1):404-412.
- Elias RJ, Kellerby SS, Decker EA. 2008. Antioxidant activity of proteins and peptides. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 48(5):430-441.

- Fellows PJ. 2022. *Food processing technology: principles and practice*. Woodhead Publishing.
- Grand View Research. 2022. *Bioactive peptides market size, share dan trends analysis report*. San Francisco: Grand View Research.
- Hajigha MN, Hajikhani B, Vaezjalali M, Kafil HS, Anari RK, Goudarzi M. 2024. Antiviral and antibacterial peptides: Mechanisms of action. *Heliyon*. 10(22).
- Hasler CM. 2002. Functional foods: Benefits, concerns and challenges. *J Nutr*. 132(12):3772-3781.
- Hayes M. 2020. Measuring protein content in food: An overview of methods. *Foods*. 9(10):1340.
- Huang D, Ou B, Prior RL. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem*. 53(6):1841-1856.
- Jiang Y, Sun J, Chandrapala J, Majzoobi M, Brennan C, Zeng XA, Sun B. 2024. Recent progress of food-derived bioactive peptides: Extraction, purification, function, and encapsulation. *Food Front*. 5(3):1240-1264.
- Kedare SB, Singh RP. 2011. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol*. 48(4):412-422.
- Khirzin MH, Hilmi M, Prastujati AU, Mawardi N, Rahayu R. 2020. Karakteristik hidrolisat gelatin tulang itik dengan enzim tripsin sebagai penghambat alfa amilase. *J Ilm Inov*. 20(3).
- Klomklao S, Benjakul S, Visessanguan W, Kishimura H, Simpson BK. 2007. Purification and characterisation of trypsins from the spleen of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). *Food Chem*. 100(4):1580-1589.
- Korhonen H, Pihlanto A. 2006. Bioactive peptides: Production and functionality. *Int Dairy J*. 16(9):945-960.
- Kristinsson HG, Rasco BA. 2000. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 40(1):43-81.
- Kumar D, Tarafdar A, Dass SL, Pareek S, Badgujar PC. 2023. Antioxidant potential and amino acid profile of ultrafiltration derived peptide fractions of spent hen meat protein hydrolysate. *J Food Sci Technol*. 60(3):1195-1201.
- Kusumaningtyas E, Widiastuti R, Kusumaningrum HD, Suhartono MT. 2015. Aktivitas antibakteri dan antioksidan hidrolisat hasil hidrolisis protein susu kambing dengan ekstrak kasar bromelin. *J Teknol dan Ind*. 26(2).
- Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev*. 4(8):118.
- Lowry O, Rosebrough N, Farr AL, Randall R. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 193(1):265-275.
- Lung JKS, Destiani DP. 2017. Uji aktivitas antioksidan vitamin A, C, E dengan metode DPPH. *Farmaka*. 15(1):53-62.

- Magfirah I, Prangdimurti E, Palupi NS, Wijaya H. 2022. Penentuan struktur tiga dimensi dan profil hasil hidrolisis protein alergen arginin kinase secara in silico. *Warta IHP*. 39(1):40-46.
- Malanovic N, Lohner K. 2016. Gram-positive bacterial cell envelopes: The impact on the activity of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta*. 1858(5):936-946.
- Mojsoska B, Jenssen H. 2015. Peptides and peptidomimetics for antimicrobial drug design. *Pharmaceuticals*. 8(3):366-415.
- Mora L dan Toldrá F. 2023. Advanced enzymatic hydrolysis of food proteins for the production of bioactive peptides. *Curr Opin Food Sci*. 49:100973.
- Mundi S, Aluko RE. 2014. Inhibitory properties of kidney bean protein hydrolysate and its membrane fractions against renin, angiotensin converting enzyme, and free radicals. *Austin J Nutr Food Sci*. 2(1):1008-1019.
- Newell DG, Koopmans M, Verhoef L, Duizer E, Aidara-Kane A, Sprong H, Kruse H. 2010. Food-borne diseases the challenges still persist. *Int J Food Microbiol*. 139:3-15.
- Nielsen PM, Petersen D, Dambmann CJ. 2001. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *J Food Sci*. 66(5):642-646.
- Noble JE, Bailey MJ. 2009. Quantitation of protein. *Methods Enzymol*. 463:73–95.
- Noman A, Xu Y, Al-Bukhaiti WQ, Abed SM, Ali AH, Ramadhan AH, Xia W. 2018. Influence of enzymatic hydrolysis conditions on the degree of hydrolysis and functional properties of protein hydrolysate obtained from Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) by using papain enzyme. *Process Biochem*. 67:19-28.
- Parada RB, Marguet E, Campos C, Vallejo M. 2023. Improved antioxidant capacity of three Brassica vegetables by two-step controlled fermentation using isolated autochthone strains of the genus *Leuconostoc* spp. and *Lactiplantibacillus* spp. *Food Chem Mol Sci*. 6:100163.
- Peterson GL. 1979. Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Anal Biochem*. 100(2):201–220.
- Putri EZ, Denny Vitasari ST. 2025. Pengaruh variasi waktu, suhu, pH, dan konsentrasi enzim pada proses hidrolisis limbah tepung aren untuk Produksi bioetanol [disertasi], Surakarta: Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Rahayu HM, Utami RF. 2026. Peran protein hidrolisat dan pati termodifikasi dalam sistem pangan fungsional. *J Seni Kuliner*. 2(1).
- Restiani R. 2016. Hidrolisis secara enzimatis protein bungkil biji nyamplung menggunakan bromelain. *Biota*. 103-110.
- Salwanee S, Wan Aida WM, Mamot S, Maskat MY. 2013. Effects of enzyme concentration, temperature, pH and time on hydrolysis. *J Food Sci Technol*.
- Sethaya P, Jaturasitha S, Ketnawa S, Chaiyaso T, Sato K, Wongpoomchai R. 2021. Influence of protease and drying process on hydrolysates. *Foods*. 10(12):2994.

- Seutia FH. 2025. Aktivitas antioksidan dan antibakteri peptida bioaktif daging ayam IPB D1 hasil hidrolisis dengan enzim kimotripsin [skripsi]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Shahidi F dan Zhong Y. 2008. Bioactive peptides. *J AOAC int.* 91(4):914-931.
- Sholichah HFL. 2025. Kandungan gizi, total mikroba, dan aktivitas antioksidan daging ayam IPB-D1 dengan formulasi pakan yang berbeda [skripsi]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Singh RK, Deshpande D. 2018. Thermally induced changes in quality of chicken breast meat protein fractions. *J Nutr Food Sci.* 8(4):709.
- Steel RGD, Torrie JH. 1991. *Prinsip dan Prosedur Statistika: Suatu Pendekatan Biometrik*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.
- Steel RGD, Torrie JH, Dickey DA. 1997. *Principles and Procedures of Statistics: A Biometrical Approach* (3rd ed.). New York (NY): McGraw-Hill.
- Sumantri C, Darwati S, Mulyono RH, Sumiati, Afnan R, Ulupi N, Arief II, Wulandari Z, Cyrilla L, Baihaqi M. 2023. *Ayam lokal unggul IPB D1*. Bogor: IPB Press.
- Taylor JJ, Grace PB, Bingham SA. 2005. Optimization of enzymatic hydrolysis conditions. *Anal Biochem.* 341(2):220-229.
- United Nations. 2023. *The Sustainable Development Goals Report 2023*. New York (NY): United Nations.
- Vorob'ev MM. 2022. Modeling of proteolysis of β -lactoglobulin and β -casein by trypsin with consideration of secondary masking of intermediate polypeptides. *Int J Mol Sci.* 23(15):8089.
- Wang S, Zeng X, Yang Q, Qiao S. 2016. Antimicrobial peptides as alternatives to antibiotics. *Int J Mol Sci.* 17(5):603.
- Wijerathna R, Asanthi NAV, Ratnasooriya WD, Pathirana RN, Nelumdeniya NRM. 2018. Evaluation of in vitro antibacterial activity and phytochemical profile of aqueous leaf extract of *Asystasia variabilis*. *J Pharmacogn Phytochem.* 7(3):639-642.
- Xu B, Dong Q, Yu C, Chen H, Zhao Y, Zhang B, Yu P, Chen M. 2024. Advances in research on the activity evaluation, mechanism and structure-activity relationships of natural antioxidant peptides. *Antioxidants.* 13(4):479.
- Zalukhu ML, Phyma AR, Pinzon RT. 2016. Proses menua, stres oksidatif, dan peran antioksidan. *Cermin Dunia Kedokt.* 43(10):177-399.
- Zou TB, He TP, Li HB, Tang HW, Xia EQ. 2016. The structure-activity relationship of the antioxidant peptides from natural proteins. *Molecules.* 21(1):72.