

## **Hidrolisat protein berciri antioksidan dan antihipertensi daripada isi ikan tilapia hitam** (Protein hydrolysate with antioxidant and antihypertensive properties from black tilapia flesh)

Madzlan Kasran dan Nor Salasiah Mohamed

### **Pengenalan**

Hidrolisat protein ialah protein spesifik yang mengalami proses degradasi secara hidrolitik kepada komponen peptida yang lebih kecil sama ada secara berasid, beralkali atau melalui tindakan enzim proteolitik. Selain bertindak sebagai sumber nitrogen dan asid amino, ia mempunyai pelbagai fungsi fisiologi dalam badan. Ini termasuklah antioksidan, antibakteria, antitrombotik (trombotik merupakan salah satu punca angin ahmar yang disebabkan oleh pembekuan darah dalam saluran darah) dan antihipertensi. Peptida ini mengandungi 2 – 20 asid amino dan berat molekul kurang daripada 9,000 Da. Asid amino merupakan komponen utama dalam pelbagai metabolisme dan merupakan sebahagian daripada pusat kompleks dalam sistem biologi. Fungsi dan penggunaan asid amino bergantung kepada jenis asid amino yang mempunyai kesan secara tidak langsung yang dimanifestasikan dalam pelbagai metabolisme.

Hidrolisis bagi kebanyakan protein makanan dilakukan secara berenzim bagi menghasilkan peptida yang mempunyai ciri-ciri bioaktif. Beberapa kajian saintifik yang telah dijalankan terhadap hidrolisat protein ikan yang dihasilkan secara hidrolisis berenzim menunjukkan ciri-ciri antioksidan. Semasa proses hidrolisis, ikatan peptida terlerai dan membolehkan peptida yang aktif terhasil dan bertindak meneutralkan radikal bebas dan menghalang pengoksidaan lipid. Tindakan radikal bebas terhadap sel dan tisu dalam tubuh manusia menyumbang kepada pelbagai jenis penyakit hasil tindak balas radikal bebas terhadap sel dan tisu badan. Kajian yang telah dijalankan menunjukkan radikal bebas oksigen seperti super oksida dan radikal hidroksil bertindak sebagai pengantara kepada kecederaan atau kerosakan sel mikrovaskular dan parenkima yang berkaitan dengan keradangan tisu.

Keupayaan peptida menghalang pengoksidaan lipid bergantung kepada kehadiran beberapa asid amino dalam peptida. Asid amino tersebut ialah tirosina, histidina, metionina dan triptofan yang berupaya memerangkap ion logam yang bersifat prooksidan. Kefungsian hidrolisat protein ikan bergantung kepada beberapa faktor iaitu jenis protein, enzim yang digunakan dan darjah hidrolisis. Hidrolisat protein daripada sumber ikan yang mempunyai aktiviti antioksidan termasuklah ikan tuna, ikan kod dan hasil sampingan pemprosesan ikan kap.

Selain fungsinya sebagai antioksidan, hidrolisat protein juga berperanan sebagai antihipertensi iaitu berupaya menurunkan tekanan darah tinggi kepada tekanan darah normal. Tekanan darah tinggi merupakan salah satu masalah kesihatan yang dialami oleh masyarakat dunia. Sebanyak 15 – 20% daripada kalangan dewasa penduduk dunia mengalami masalah tekanan darah tinggi. Mekanisme yang dikaitkan dengan tekanan darah adalah disebabkan oleh sejenis enzim iaitu *angiotensin I converting enzyme* (ACE). ACE menukarkan *angiotensin I* kepada *angiotensin II* dan dalam keadaan hipertensi, *angiotensin II* meningkatkan tekanan oksidatif yang mengganggu fungsi sel melalui rangsangan terhadap pembentukan radikal bebas.

Untuk mengatasi masalah tekanan darah tinggi, perencat ACE diperlukan. Perencat ACE sintetik yang biasa digunakan termasuklah *Captopril*, *Enalapril* dan *Lisinopril* (ubat darah tinggi). Walau bagaimanapun, perencat ACE sintetik menyebabkan kesan sampingan seperti batuk, kehilangan deria rasa, gangguan buah pinggang dan edema angioneurotik. Sumber lain sebagai pengganti perencat ACE sintetik diperlukan bagi mengatasi masalah darah tinggi. Kajian terdahulu menunjukkan hidrolisat protein yang mengandungi peptida bioaktif berupaya merencat enzim ACE. Antaranya termasuklah hidrolisat protein daripada bahan sampingan pemprosesan sardin dan hidrolisat protein wei.

Dalam kajian ini, hidrolisat protein daripada isi ikan tilapia hitam (*Oreochromis mossambicus*) telah dihasilkan. Ujian aktiviti antioksidan (Asai Kuasa Penurunan Ion Ferik (FRAP) dan 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)) dan antihipertensi (perencatan enzim ACE secara *in vitro*) terhadap hidrolisat protein telah dilaksanakan. Ikan tilapia hitam merupakan ikan bernilai rendah dan penghasilan hidrolisat protein daripada ikan tilapia hitam akan meningkatkan nilai tambah ikan tersebut yang boleh diaplikasikan dalam pelbagai produk makanan sebagai ingredien makanan.

### **Penghasilan hidrolisat protein daripada isi ikan tilapia hitam**

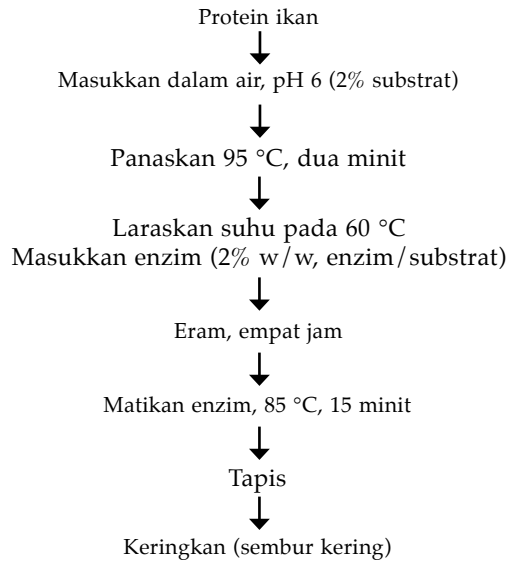
Hidrolisat protein yang mempunyai ciri-ciri antioksidan dan antihipertensi telah dihasilkan secara hidrolisis berenzim daripada isi ikan tilapia hitam. Ikan tilapia hitam dicuci, isinya diasingkan dan kemudiannya hidrolisis dilakukan dengan mengering isi ikan tilapia dengan enzim papain. Selain papain, hidrolisis juga boleh dilakukan oleh enzim proteolitik yang lain seperti bromelain, alkalase dan flavourzyme. Proses hidrolisis yang optimum bagi menghasilkan hidrolisat yang mempunyai ciri-ciri antioksidan dan antihipertensi bergantung kepada jenis enzim, suhu penderaman, pH dan kepekatan enzim. Penderaman dengan enzim papain dilakukan pada suhu 60 °C pada pH 6 dan kepekatan substrat 2% daripada berat protein. Selepas penderaman, aktiviti enzim dimatikan pada suhu 85 °C selama 15 minit. Hidrolisat yang terhasil ditapis dan dikeringkan

menggunakan penyembur kering. Penyediaan hidrolisat protein ditunjukkan seperti dalam *Carta alir 1* dan hidrolisat protein ditunjukkan seperti dalam *Gambar 1*.

Darjah hidrolisis digunakan untuk mengukur tahap sesuatu proses hidrolisis. Darjah hidrolisis ditakrifkan sebagai perkadaran ikatan peptida yang terpotong semasa hidrolisis protein. Proses hidrolisis ini akan menghasilkan peptida bersaiz kecil serta asid amino dengan berat molekul kurang daripada 9,000 Da. Saiz molekul peptida yang kecil ini mudah diserap dan boleh membantu meningkatkan nilai pemakanan protein yang akan menghasilkan beberapa fungsi di dalam badan seperti sebagai antioksidan dan antihipertensi. *Rajah 1* menunjukkan hidrolisis telah mencapai tahap yang optimum selepas empat jam dengan darjah hidrolisis mencapai 84%. Selepas empat jam darjah hidrolisis tidak menunjukkan perubahan yang signifikan dengan peratus darjah hidrolisis sebanyak 84%.

#### **Kandungan asid amino hidrolisat protein isi ikan tilapia hitam**

Kandungan asid amino hidrolisat protein ikan tilapia hitam ditunjukkan seperti dalam *Rajah 2*. Jumlah asid amino ialah 87.38 g/100 g sampel. Sementara asid amino perlu ialah 38.75 g/100 g sampel dan asid amino tak perlu pula ialah 48.63 g/100 g sampel. Asid amino perlu ialah asid amino yang tidak dihasilkan oleh badan dan perlu diambil melalui pemakanan seperti histidina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofan, valina, isoleusina dan leusina. Asid amino tak perlu ialah asid amino yang boleh dihasilkan oleh badan. Terdapat sebelas asid amino tak perlu iaitu alanina, asparagin, sisteina, glutamin, glisina, prolina, serina, tirosina, glutamin, asid glutamik dan asid aspartik. Komposisi asid amino di dalam hidrolisat protein menunjukkan kandungan asid glutamik adalah yang tertinggi diikuti oleh asid aspartik. Asid glutamik dan asid aspartik membantu menyumbang kepada sifat antioksidan

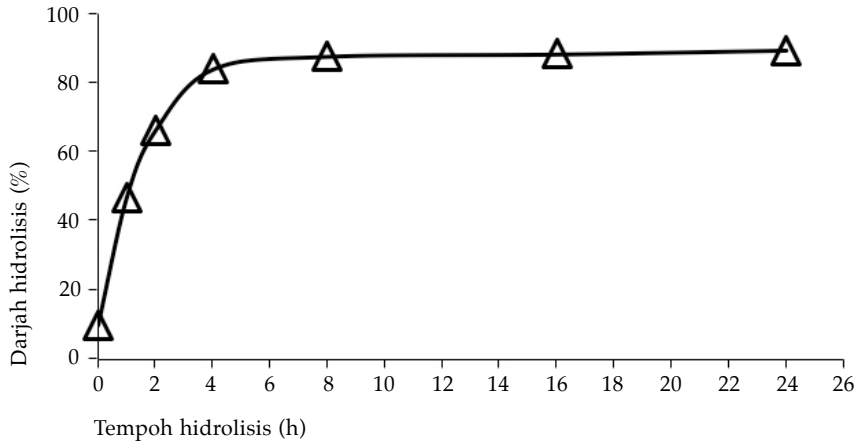


*Carta alir 1. Penghasilan hidrolisat protein*

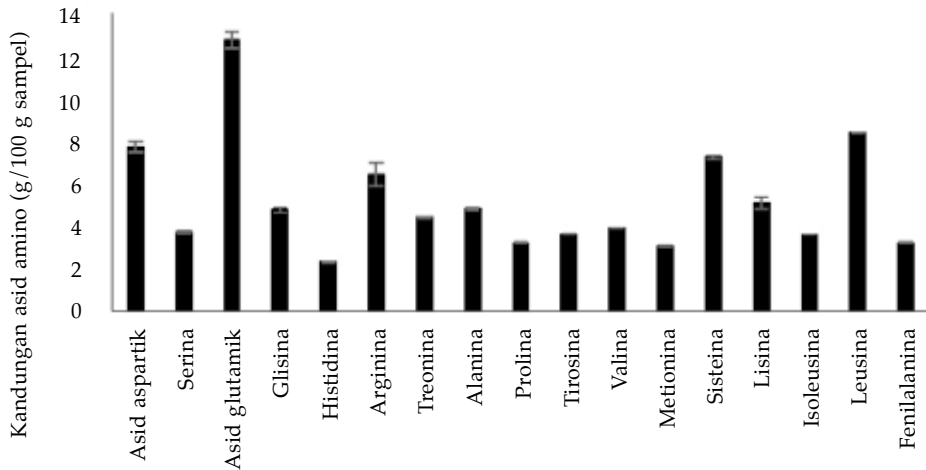


*Gambar 1. Hidrolisat protein*

Lengkuk darjah hidrolisis hidrolisat protein isi ikan tilapia hitam yang dihidrolisis oleh papain (2% substrat, 2% enzim dan 10 mM L-cysteine)



Rajah 1. Darjah hidrolisis protein oleh enzim papain



Rajah 2. Kandungan asid amino hidrolisat protein isi ikan tilapia hitam

dalam protein ikan. Selain itu, hidrolisat protein ikan tilapia hitam juga menunjukkan kandungan asid amino hidrofobik yang tinggi iaitu sebanyak 34.55 g/100 g sampel dan tidak termasuk triptofan. Terdapat sembilan jenis asid amino hidrofobik iaitu glisina, alanina, valina, leusina, isoleusina, prolina, fenilalanina, metionina dan triptofan. Kajian terdahulu menunjukkan peptida yang mengandungi asid amino hidrofobik yang tinggi mempunyai ciri-ciri antioksidan dan antihipertensi. Oleh itu, sifat-sifat antioksidan dan antihipertensi peptida boleh dikaitkan dengan kehadiran asid amino hidrofobik yang tinggi.

### **Aktiviti antioksidan hidrolisat protein isi ikan tilapia hitam**

Aktiviti antioksidan hidrolisat protein yang dihasilkan diuji dengan dua kaedah iaitu melalui perencatan radikal bebas 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) dan asai kuasa penurunan ion ferik (FRAP Assay). DPPH ialah radikal bebas yang stabil dan untuk meneutralkannya, ia perlu menerima hidrogen. Kaedah DPPH adalah yang paling biasa digunakan untuk menilai aktiviti antioksidan kerana kaedahnya yang mudah dan cepat. Kesan antioksidan terhadap pemerangkapan radikal bebas DPPH berlaku disebabkan oleh keupayaan hidrolisat protein untuk mendermakan hidrogen kepada radikal bebas DPPH yang mengakibatkan larutan bertukar daripada warna ungu kepada kuning.

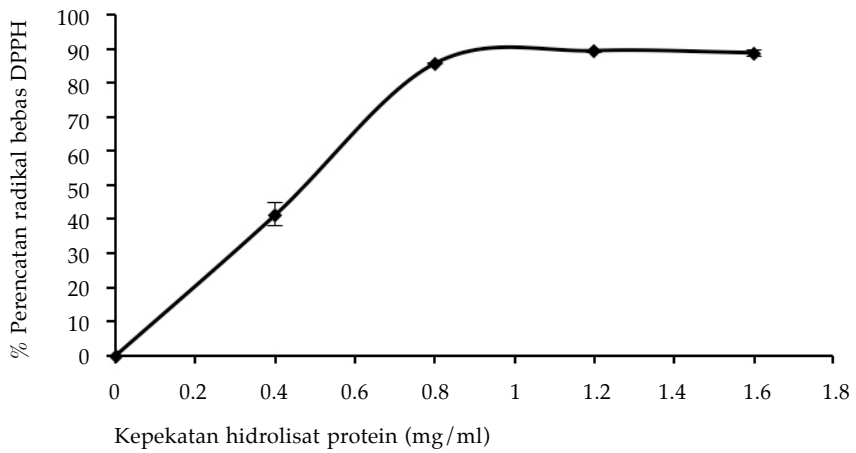
Kaedah asai FRAP adalah berdasarkan kepada pengukuran keupayaan hidrolisat protein untuk bertindak sebagai agen penurunan yang menurunkan ion  $\text{Fe}^{3+}$  kepada  $\text{Fe}^{2+}$  yang asalnya digunakan untuk mengukur kapasiti antioksidan di dalam plasma darah. Dalam kaedah ini, antioksidan bertindak sebagai agen penurunan sementara ion ferum (III) sebagai agen pengoksida. Feriktripiridiltriazin yang diturunkan kepada kompleks ferum membentuk warna biru yang sangat terang dan keamatan warna biru menunjukkan keupayaan sampel menurunkan ion  $\text{Fe}^{3+}$  kepada  $\text{Fe}^{2+}$ .

*Rajah 3* menunjukkan keupayaan hidrolisat protein ikan tilapia hitam dalam memerangkap dan merencat aktiviti radikal bebas DPPH pada kepekatan yang berbeza. Keupayaan hidrolisat protein merencat radikal bebas meningkat dengan meningkatnya kepekatan hidrolisat protein dan mencapai tahap yang optimum pada kepekatan 0.8 mg/ml. Penambahan kepekatan hidrolisat protein selepas itu tidak menunjukkan perubahan yang signifikan terhadap perencatan radikal bebas. Secara *in vitro*, hidrolisat protein menunjukkan aktiviti antioksidan yang tinggi (perencatan radikal bebas DPPH sebanyak 90% dengan nilai  $\text{IC}_{50}$  ialah 0.47 mg/ml).

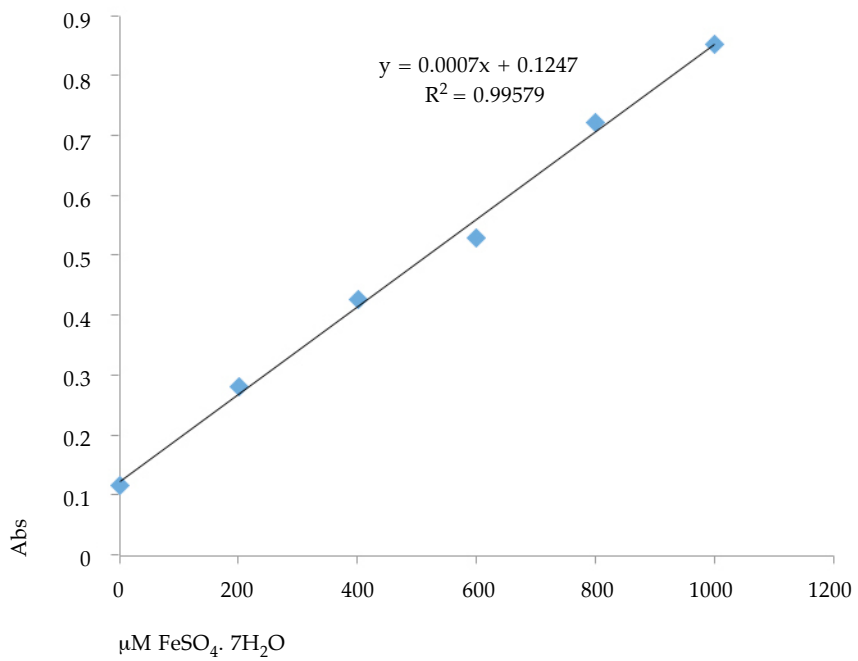
*Rajah 4* menunjukkan lengkung piawai bagi menentukan nilai FRAP. Semakin tinggi nilai FRAP menunjukkan keberkesanan dan keupayaan hidrolisat protein untuk bertindak sebagai agen penurunan yang menurunkan ion  $\text{Fe}^{3+}$  kepada  $\text{Fe}^{2+}$ . Nilai FRAP hidrolisat protein ikan tilapia hitam adalah sebanyak 166 mM  $\text{Fe}(\text{II})/\text{g}$  berat kering sampel.

### **Aktiviti antihipertensi hidrolisat protein isi ikan tilapia hitam**

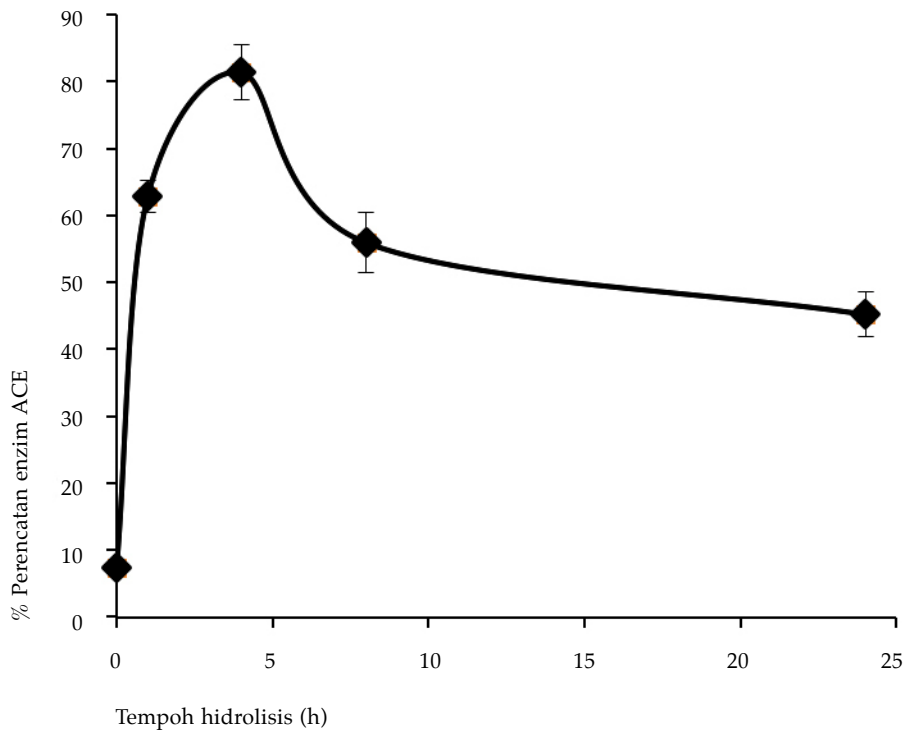
Kesan antihipertensi hidrolisat protein diukur dengan peratus keupayaan hidrolisat protein untuk merencat aktiviti enzim ACE. *Rajah 5* menunjukkan aktiviti perencatan enzim ACE oleh hidrolisat protein pada tempoh masa hidrolisis yang berbeza iaitu 0 – 24 jam. Aktiviti antihipertensi menunjukkan perencatan enzim ACE sebanyak 81% dengan tempoh hidrolisis optimum selama empat jam. Hidrolisis selama empat jam telah



Rajah 3. Peratus keupayaan hidrolisat protein merencat aktiviti radikal bebas DPPH



Rajah 4. Lengkok piawai bagi penentuan nilai FRAP



Rajah 5. Aktiviti perencatan enzim ACE oleh hidrolisat protein pada tempoh masa hidrolisis yang berbeza

menghasilkan hidrolisat protein dengan berat molekul yang lebih kecil berbanding dengan berat molekul protein asal. Kajian terdahulu mendapati hidrolisat protein dengan berat molekul 3 – 5 kDa menunjukkan aktiviti perencatan enzim ACE yang paling optimum. Akan tetapi aktiviti perencatan enzim ACE berkurangan apabila tempoh hidrolisis dipanjangkan yang menyebabkan berat molekul hidrolisat protein menjadi bertambah kecil. Oleh itu, hidrolisis selama empat jam memadai untuk menghasilkan peptida dengan berat molekul yang berupaya untuk merencatkan aktiviti enzim ACE.

### Kesimpulan

Hidrolisat protein yang mempunyai ciri-ciri antioksidan dan antihipertensi daripada isi ikan tilapia hitam telah dihasilkan secara hidrolisis berenzim. Hidrolisis dilakukan dengan mengeringkan isi ikan tilapia dengan enzim papain pada suhu 60 °C selama empat jam. Darjah hidrolisis telah mencapai tahap yang optimum selepas empat jam hidrolisis dengan darjah hidrolisis mencapai 84%. Keupayaan hidrolisat protein merencatkan radikal bebas DPPH mencapai tahap yang optimum pada kepekatan 0.8 mg/ml. Secara in vitro, hidrolisat protein menunjukkan aktiviti antioksidan yang tinggi (perencatan radikal bebas DPPH

sebanyak 90% dengan nilai IC<sub>50</sub> 0.47 mg/ml). Nilai FRAP hidrolisat protein ikan tilapia hitam adalah sebanyak 166 mM Fe(II)/g berat kering sampel. Aktiviti antihipertensi menunjukkan perencatan enzim ACE sebanyak 81% dengan tempoh hidrolisis optimum selama empat jam. Hidrolisat protein daripada ikan tilapia hitam ini boleh memberi nilai tambah sebagai ingredien makanan apabila diaplikasikan dalam pelbagai produk makanan.

### **Penghargaan**

Setinggi-tinggi penghargaan diucapkan kepada Mohd. Fakhri Hashim, Fadzilah Puteh dan Zuwariah Ishak daripada Pusat Penyelidikan Sains dan Teknologi Makanan, Ibu Pejabat MARDI, Serdang atas sumbangan dalam membantu menjayakan projek ini. Projek ini dibiayai oleh Projek Pembangunan Rancangan Malaysia Ke-10, MARDI dengan tajuk projek: Penyelidikan produk nilai ditambah tinggi daripada rumpai laut tempatan, akuakultur dan pertanian dengan kod projek 21003001630001.

### **Bibliografi**

- Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y. dan Nasri, M. (2009) Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chem.* 114: 1,198 – 1,205
- Brown, N.J. dan Vaughan, D.E. (1998). Angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Circulation* 97: 1,411 – 1,420
- Chalamaiah, M., Jyothirmayi, T., Bhaskarachary, K., Vajreswari, A., Hemalatha, R. dan Dinesh Kumar, B. (2013). Chemical composition, molecular mass distribution and antioxidant capacity of rohu (*Labeo rohita*) roe (egg) protein hydrolysates prepared by gastrointestinal proteases. *Food Res Int.* 52: 221 – 229
- Cheung, I.W.Y., Cheung, L.K.Y., Tan, N.Y. dan Li-Chan, E.C.Y. (2012). The role of molecular size in antioxidant activity of peptide fractions from Pacific hake (*Merluccius productus*) hydrolysates. *Food Chem.* 134: 1,297 – 1,306
- Halliwell, B. (1994). Free radicals, antioxidants and human disease: Curiosity, cause, or consequence. *Lancet* 344: 721 – 724
- Je, J.Y., Lee, K.H., Lee, M.H. dan Ahn, C.B. (2009). Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis. *Food Res Int.* 42: 1,266 – 1,272
- Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D. dan Shahidi, F. (2007). Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food Chem.* 102: 1,317 – 1,327
- Leanderson, P., Faresjo, A.O. dan Tagesson, C. (1997). Green tea polyphenols inhibits oxidant-induced DNA strand breakage in cultured lung cells. *Free Radical Biology and Medicine* 23: 235 – 242
- Murray, B.A. dan FitzGerald, R.J. (2007). Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins: Biochemistry, bioactivity and production. *Current Pharmaceutical Design* 13: 773 – 791
- Naqash, S.Y. dan Nazeer, R.A. (2013). Antioxidant and functional properties of protein hydrolysates from pink perch (*Nemipterus japonicus*) muscle. *J. Food Sci. Technol.* 50: 972 – 978
- Peng, X., Xiong, Y. L. dan Kong, B. (2009). Antioxidant activity of peptide fractions from whey protein hydrolysates as measured by electron spin resonance. *Food Chemistry* 113: 196 – 201



- Rutherford, S.M. (2010). Methodology for determining degree of hydrolysis of proteins in hydrolysates: A review. *J. AOAC Int.* 93(5): 1,515 – 1,522
- Ryszard, A. (2008). Antioxidant activity of protein hydrolysates. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 110: 489 – 490
- Slizyte, R., Mozuraityte, R., Martinez-Alvarez, O., Falch, E., FouchereauPeron, M. dan Rustad, T. (2009). Functional, bioactive and antioxidative properties of hydrolysates obtained from cod (*Gadusmorhua*) backbones. *Process Biochem.* 44: 668 – 677
- Soares, J.R., Dins, T.C.P., Cunha, A.P. dan Ameida, L.M. (1997). Antioxidant activity of some extracts of *Thymus zygis*. *Free Radical Research* 26: 469 – 478
- Udenigwe, C.C., Linb, Y.S., Houc, W.C. dan Aluko, R.E. (2009). Kinetics of the inhibition of renin and angiotensin I-converting enzyme by flaxseed protein hydrolysate fractions. *Journal of Functional Foods* 1: 199 – 207
- You, L., Zhao, M., Regenstein, J.M. dan Ren, J. (2010). Purification and identification of antioxidative peptides from loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. *Food Res. Int.* 43: 1,167 – 1,173
- Zhang, Y., Lee, E.T., Devereux, R.B., Yeh, J., Best, L.G., Fabsitz, R.B. dan Howard, B.V. (2006). Pre-hypertension, diabetes and cardiovascular disease risk in a population-based sample: the strong heart study. *Hypertension* 47: 410 – 414
- Zhong, S., Ma, C., Lin, Y.C. dan Luo, Y. (2011). Antioxidant properties of peptide fractions from silver carp (*Hypophthalmich thysmolitrix*) processing by-product protein hydrolysates evaluated by electron spin resonance spectrometry. *Food Chem.* 126: 1,636 – 1,642

## Ringkasan

Hidrolisat protein ialah protein spesifik yang mengalami proses degradasi secara hidrolitik kepada komponen peptida yang lebih kecil sama ada secara berasid, beralkali atau melalui tindakan enzim proteolitik. Selain bertindak sebagai sumber nitrogen dan asid amino, ia mempunyai pelbagai fungsi fisiologi dalam badan. Hidrolisat protein yang mempunyai ciri-ciri antioksidan dan antihipertensi daripada isi ikan tilapia hitam telah dihasilkan melalui hidrolisis secara berenzim menggunakan enzim papain. Kajian antioksidan dan antihipertensi telah dijalankan ke atas hidrolisat protein yang dihasilkan. Dua kaedah analisis antioksidan telah dijalankan iaitu perencatan radikal bebas 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) dan asai kuasa penurunan ion ferik (FRAP Assay). Analisis antihipertensi pula berdasarkan perencatan *angiotensin I converting enzyme* (ACE) oleh hidrolisat protein. Darjah hidrolisis digunakan untuk mengukur tahap sesuatu proses hidrolisis. Darjah hidrolisis mencapai tahap yang optimum selepas empat jam hidrolisis dengan darjah hidrolisis mencapai 84%. Secara *in vitro*, hidrolisat protein menunjukkan aktiviti antioksidan yang tinggi (perencatan radikal bebas DPPH sebanyak 90% dengan nilai IC<sub>50</sub> 0.47 mg/ml). Nilai FRAP pula adalah sebanyak 166 mM Fe(II)/g berat kering sampel. Aktiviti antihipertensi menunjukkan perencatan enzim ACE sebanyak 81% dengan tempoh hidrolisis optimum selama empat jam.

### **Summary**

Hydrolysed protein is a protein that undergoes hydrolytic degradation process to a smaller peptide component either acidically, alkaline or through proteolytic enzyme. Hydrolysed protein is a specific protein. In addition to acting as a source of nitrogen and amino acids, it has various physiological functions in the body. Protein hydrolysate with antioxidant and antihypertensive properties from black tilapia have been produced enzymatically using papain. Antioxidant and antihypertensive studies have been carried out on the protein hydrolysate. Two methods were carried out namely the free radical scavenging of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and Ferric Reducing Antioxidant Power Assay (FRAP Assay). Antihypertensive analysis is based on inhibition of angiotensin I converting enzyme (ACE) by protein hydrolysate. The degree of hydrolysis is used to measure the stage of a hydrolysis process. The degree of hydrolysis has reached an optimum level after four hours of hydrolysis with a degree of hydrolysis reaches 84%. In vitro, the bioactivity of these hydrolysates when analysed showed high antioxidant activity (DPPH inhibition, 90% with  $IC_{50}$  value of 0.47 mg/ml, FRAP value, 166 mM Fe(II)/g dry wt. sample and antihypertension activity (Angiotensin converting enzyme inhibitory activity, 81%) with four hour of hydrolysis was the optimum time of hydrolysis.

### **Pengarang**

Madzlan Kasran

Pusat Penyelidikan Sains dan Teknologi Makanan, Ibu Pejabat MARDI,  
Persiaran MARDI-UPM, 43400 Serdang, Selangor

E-mel: madzlan@mardi.gov.my