

Aktivitas Antioksidan Hidrolisat Protein Ikan Cunang (*Congresox talabon*) **Antioxidant Activity of Protein Hydrolysate Cunang Fish (*Congresox talabon*)**

Anggi Angelita Hermaya¹, Edison¹, Andarini Diharmi^{1a}

¹Jurusan Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan dan Kelautan, Universitas Riau
Kampus Bina Widya Jl. HR Soebrantas Km. 12,5 Simpang Baru, Pekanbaru, Riau 28293.

^aKorespondensi: Andarini Diharmi, Email: rini_abrar@yahoo.com

(Diterima oleh Dewan Redaksi : 22 - 12 - 2020)
(Dipublikasikan oleh Dewan redaksi : 28 - 04 - 2021)

ABSTRACT

Cunang fish (*Congresox talabon*) has the potential as a raw material for fish protein hydrolyzates. Hydrolysis of cunang fish using the enzyme papain were produced peptides and amino acids that have antioxidant activity. The aim of this study was to determine the antioxidant activity of the protein hydrolyzate of cunang fish using different papain enzyme concentrations. This study used an experimental method with a completely randomized non-factorial design with three replications, different of treatment papain enzyme concentrations (2%, 4%, 6%). The analysis parameters consisted of proximate content analysis in fish meat, degree of hydrolysis, the dissolved protein of the Bradford method, and the antioxidant activity of the DPPH method. The results showed that the protein content of cunang fish had 73.15% (bk). The papain enzyme concentration of 6% was the best concentration hydrolyze cunang meat was produced. protein hydrolysate. The papain enzyme concentration of 6% is the best concentration to hydrolyze the cunang fish meat produced by protein hydrolyzate. The results of the hydrolyzate analysis showed that the degree of hydrolysis, dissolved protein and antioxidant activity was 46.23%, 11.64% and a 549.16 ppm, respectively. Enzyme hydrolysis can increase dissolved protein content directly proportional to the increase in antioxidant activity.

Keyword: antioksidan activity, cunang fish, protein hydrolyzate, papain enzyme

ABSTRAK

Ikan cunang (*Congresox talabon*) berpotensi sebagai bahan baku hidrolisat protein ikan. Hidrolisis ikan cunang menggunakan enzim papain dapat menghasilkan peptida dan asam amino yang memiliki aktivitas antioksidan. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan aktivitas antioksidan pada hidrolisat protein ikan cunang dengan menggunakan konsentrasi enzim papain berbeda. Penelitian ini menggunakan metode eksperimen dengan rancangan acak lengkap non faktorial tiga ulangan, perlakuan konsentrasi enzim papain berbeda (2%, 4%, 6%). Parameter analisis terdiri atas analisis kadar proksimat pada daging ikan, derajat hidrolisis, protein terlarut metode Bradford, dan aktivitas antioksidan metode DPPH. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar protein ikan cunang memiliki 73,15% (bk). Konsentrasi enzim papain 6% merupakan konsentrasi terbaik untuk menghidrolisis daging ikan cunang dihasilkan hidrolisat protein. Hasil analisis hidrolisat protein ikan cunang dihasilkan derajat hidrolisis sebesar 46,23%, protein terlarut sebesar 11,64% dan aktivitas antioksidan sebesar 549,16 ppm. Hidrolisis enzim dapat meningkatkan kadar protein terlarut yang berbanding lurus dengan peningkatan aktivitas antioksidan.

Kata Kunci: aktivitas antioksidan, ikan Cunang, hidrolisat protein ikan, Enzim Papain,

PENDAHULUAN

Perikanan laut merupakan salah satu sektor yang dapat diharapkan sebagai sektor unggulan di Indonesia. Salah satu komoditi perikanan laut yang dapat dimanfaatkan yaitu ikan cunang (*Congresox talabon*). Ikan cunang biasanya tidak dalam keadaan utuh, dikarenakan gelembung renang ikan tersebut terlebih dahulu diambil sebelum dipasarkan. Dikarenakan masyarakat lebih sering memanfaatkan gelembung renang ikan cunang, daging pada ikan tersebut masih terbilang jarang dimanfaatkan. Daging ikan cunang dapat dimanfaatkan salah satunya dalam pembuatan hidrolisat protein ikan menggunakan enzim papain.

Ikan cunang tersebar di beberapa perairan seperti perairan Indonesia, Malaysia, Filipina dan Jepang. Ikan ini tersebar di laut dalam perairan Sumatera hingga Sulawesi Indonesia (Satapoomin 2011). Ikan cunang merupakan ikan buas yang biasanya memakan ikan lainnya. Menurut Laksono *et al.* (2019) kadar protein ikan cunang yaitu sebesar 12,27 dalam basis basah. Kadar protein yang cukup tinggi tersebut dapat memanfaatkan daging ikan cunang sebagai bahan baku dalam pembuatan hidrolisat protein ikan.

Istilah hidrolisis biasanya berkaitan dengan air serta dua atau lebih komponen produk (Kirk dan Othmerd 1953). Dalam pembuatan hidrolisis dapat dilakukan dengan dua cara salah satunya yaitu secara enzimatis. Secara teoritis, metode yang paling efektif dalam proses hidrolisis protein yaitu menggunakan enzim, dikarenakan peptida-peptida yang mudah pecah serta kurang kompleks dapat dihasilkan oleh enzim. Selain itu, hidrolisis menggunakan enzim dapat membentuk perubahan pada produk hidrolisat yang bersifat non hidrolitik serta terhindar dari kerusakan produk (Johnson dan Peterson 1974).

Hidrolisat protein merupakan produk yang berasal dari proses hidrolisis oleh asam, basa, enzim atau fermentasi sehingga terjadinya penguraian protein menjadi asam amino dan peptida (Pasupuleti dan Demain 2010). Hidrolisat protein dapat

dimanfaatkan sebagai antoksidan karena dapat menunjukkan kemampuannya dalam donor proton, pengikat ion logam, dan memerangkap radikal bebas (*free radical scavenging*) (Samaranayaka dan Li-Chan 2011). Dalam pembuatan hidrolisat protein ikan, biasanya dapat menggunakan enzim papain.

Enzim papain merupakan enzim golongan protease sulfhidril dan golongan tiolnprotease eukariotik yang memiliki sisi aktif sistein (Zusfahair *et al.* 2014). Papain dapat mengkatalis proses hidrolisis dengan baik pada kondisi suhu serta pH dalam kisaran waktu tertentu dikarenakan aktivitas enzim papain cukup spesifik. Sisi aktif yang dimiliki oleh papain terdiri dari asam amino yaitu sistein dan histidin. Salah satu diantara kedua asam amino tersebut, sistein yang mempunyai sifat aktif dikarenakan didalamnya terdapat sebuah gugus tiol (-SH).

Radikal bebas merupakan ketidakstabilan sebuah molekul yang memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada orbit luarnya. Target utama radikal bebas adalah protein, asam lemak tak jenuh, karbohidrat dan lipoprotein, serta unsur-unsur DNA (Sadeli 2016). Untuk melindungi tubuh serta mengurangi radikal bebas didalam tubuh, dibutuhkan sebuah zat penting yang disebut antioksidan. Salah satu macam antioksidan yaitu antioksidan enzimatis atau memiliki nama lain antioksidan primer. Enzim-enzim berkerja dengan mengubah produk menjadi lebih stabil menggunakan cara pemutusan reaksi berantai dengan penghambatan pembentukam radikal bebas.

METODE PENELITIAN

Bahan dan alat

Bahan baku yang digunakan adalah ikan cunang (*Congresox talabon*) berupa daging yang berasal dari Bengkalis, Riau. Bahan-bahan kimia yang digunakan yaitu enzim papain merk Xian Lyphar Biotech, aquades, HCl, NaOH, H₂SO₄, Cu kompleks, kloroform, aquades, indikator PP, H₂BO₃, indikator campuran (metilen merah biru),

TCA (*trichloroacetic acid*) 20%, radikal bebas DDPH (*2,2-difenil-1-pikrilhidrazil*), metanol, bofin serum albumin (BSA), serta reagen Bradford.

Peralatan yang digunakan yaitu *beaker glass*, *hot plate*, *sentrifuge*, blender, pH-meter, inkubator, desikator, spektrofotometer, tabur pengabuan, buret, timbangan digital, pipet tetes, labu kjedahl, labu lemak, tabung reaksi, gelas ukur, labu erlenmeyer, corong gelas, cawan porselin, spatula, penjepit, *hot plate*, *magnetic stirrer*, botol sampel kertas label, saringan sarung tangan dan masker mulut.

Metode penelitian adalah eksperimen dengan melakukan percobaan secara langsung dalam proses pembuatan hidrolisat protein serta pengujian aktivitas antioksidannya yang menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) non faktorial. Perlakuan yang digunakan adalah konsentrasi enzim papain berbeda, terdiri dari 3 taraf (konsentrasi enzim 2%; 4%; 6%). Ulangan yang digunakan sebanyak 3 kali, sehingga jumlah unit percobaan sebanyak 9 unit.

Pembuatan hidrolisat protein ikan cunang (*Congresox talabon*)

Ikan cunang segar yang telah mati selanjutnya difillet untuk pengambilan daging dan kemudian ikan dihaluskan menggunakan blender. Sebagian daging ikan yang telah dihaluskan, dilakukan analisis proksimat. Daging dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan dicampurkan dengan aquades, dengan perbandingan anatara daging dan aquades (1:4). Kemudian dilakukan inaktivasi enzim yang terdapat pada daging dengan cara dipanaskan pada suhu 60°C selama 15 menit. Daging yang telah tercampur tersebut diaduk kemudian dilakukan pengaturan pH 7. NaOH digunakan sebagai suasana basa. Campuran ditambahkan enzim papain konsentrasi 2%, 4%, dan 6% (b/v) kemudian dihidrolisis menggunakan inkubator pada suhu 55°C selama 5 jam. Hasil hidrolisis tersebut dilakukan inaktivasi enzim dengan cara dipanaskan pada suhu 85°C selama 15 menit. Sampel kemudian disentrifugasi dengan

kecepatan 5000 ppm selama 20 menit. Ini bertujuan untuk memisahkan antara persipitat serta supernatan. Hidrolisat protein yang dihasilkan berupa supernatan kemudian dianalisis derajat hidrolisis, analisis protein terlarut metode Bradford serta analisis aktivitas antikosidan metode DDPH.

Analisis Derajat Hidrolisis (Amiza *et al.* 2012)

Masing-masing sampel hidrolisat ditimbang seberat 1 g dan ditambahkan TCA 10% sebanyak 2 mL. Agar terjadi endapan, campuran tersebut didiamkan selama kurang lebih 30 menit. Campuran yang telah didiamkan disentrifugasi dengan kecepatan 10000 ppm selama 5 menit. Supernatan yang didapat dianalisis kadar nitrogennya menggunakan metode kjeldahl (AOAC 2005).

Analisis Protein Terlarut (Bradford 1976)

Untuk menghitung protein terlarut terlebih dahulu dilakukan dengan pembuatan larutan Bradford serta larutan bofin serum album (BSA). Larutan Bradford dibuat menggunakan cara mereaksikan 25 mg *coomassie brilliant blue* G-250 dengan 12,5 ml etanol 95%. Hasil dari reaksi tersebut diencerkan menggunakan 500 ml akuades. Sebelum dilakukan pengenceran, larutan tersebut disaring menggunakan kertas saring serta diencerkan sebanyak lima kali sebelum dilakukan pengukuran absorbansinya.

Untuk membuat larutan stok menggunakan konsentrasi 2 mg/ml, dilakukan dengan cara melarutkan 100 mg protein BSA ke dalam 50 ml akuades. Pengenceran dilakukan menggunakan larutan stok menjadi larutan dengan berbagai konsentrasi yang lebih rendah yaitu 0,1-1 mg/ml.

Untuk mengukur protein terlarut metode Bradford dilakukan dengan cara mereaksikan 0,1 ml larutan sampel hidrolisat dengan 5 ml larutan Bradford di dalam tabung reaksi. Larutan tersebut diinkubasi selama limat menit dan kemudian diukur absorbansinya dengan

spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm.

Analisis Aktivitas Antioksidan metode DPPH

Masing-masing hidrolisat dengan konsentrasi berbeda sebanyak 30 mg dilarutkan dalam 30 mL metanol yang digunakan sebagai larutan induk sehingga konsentrasi sampel menjadi 1000 ppm. Larutan induk pada hidrolisat 1000 ppm tersebut dibuat pengenceran sampel dengan konsentrasi 1000, 500, 250, 125 dan 62,5 ppm, kemudian masing-masing konsentrasi dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Setiap konsentrasi tersebut ditambahkan 1 ml larutan DPPH dan kemudian dihomogenkan. Konsentrasi yang telah ditambahkan larutan DPPH diinkubasi dalam ruangan gelap atau terhindar dari sinar matahari selama 30 menit. Setiap konsentrasi dilakukan pengukuran absorbansi dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 520 nm. Sebagai kontrol digunakan yang digunakan 4,5 ml metanol dan 0,5 ml DPPH.

Nilai dari masing-masing konsentrasi sampel dengan persen inhibisinya diplot masing-masing pada sumbu x dan y pada persamaan regresi linear. Untuk mencari nilai IC_{50} (*inhibitor concentration 50%*) pada setiap sampel dapat menggunakan persamaan linear yang diperoleh dalam bentuk persamaan $y=a+bx$, dimana nilai y dinyatakan sebagai 50 dan nilai x merupakan nilai IC_{50} pada setiap perlakuan. Besarnya konsentrasi yang dibutuhkan untuk dapat mereduksi radikal bebas sebesar 50% dinyatakan sebagai nilai IC_{50} .

HASIL DAN PEMBAHASAN

Preparasi dan Proporsi Ikan Cunang (*Congresox talabon*)

Bahan baku ikan cunang yang didapat dari Perairan Bengkulu tersebut dilakukan penyiangan untuk memisahkan antara daging, kulit, tulang, isi perut serta kepala. Untuk mendapatkan persentase bagian tubuh ikan, dilakukan perhitungan proporsi. Nilai proporsi yang didapatkan dari hasil

penyiangan cunang per ekor disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Proporsi bagian tubuh ikan cunang

Bagian Ikan	Persentase (%)
Daging	54,50
Kulit	6,33
Tulang	30,50
Insang	0,67
Kepala	6,17
Isi perut	1,83

Bagian yang didominasi pada tubuh ikan cunang yaitu bagian daging. Proporsi daging ikan cunang tersebut mencapai 54,50%. Daging ikan cunang tersebut berwarna putih, memiliki tekstur yang lembut dan berlapis, dan pada daging tersebut terdapat tulang. Bagian kepala ikan cunang terdiri dari ujung mulut terdepan hingga ujung tutup insang paling belakang. Kulit ikan cunang tersebut elastis dan tipis yang digunakan sebagai pelindung. Bagian isi perut ikan cunang terdiri dari jantung, hati, usus, lambung, ginjal, gonad dan pankreas.

Komposisi Kimia Ikan Cunang

Untuk mendapat data dari komposisi kimia, dilakukan pengujian analisis proksimat. Analisis proksimat terdiri dari analisis kadar air, abu, lemak serta protein. Hasil analisis proksimat pada daging ikan cunang yang diperoleh dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Proksimat daging ikan cunang

Komposisi	%
Air (bb)	73,95 ± 0,66
Protein (bk)	73,15 ± 0,12
Abu (bk)	15,15 ± 0,33
Karbohidrat (bk)	9,77 ± 0,33
Lemak (bk)	1,93 ± 0,03

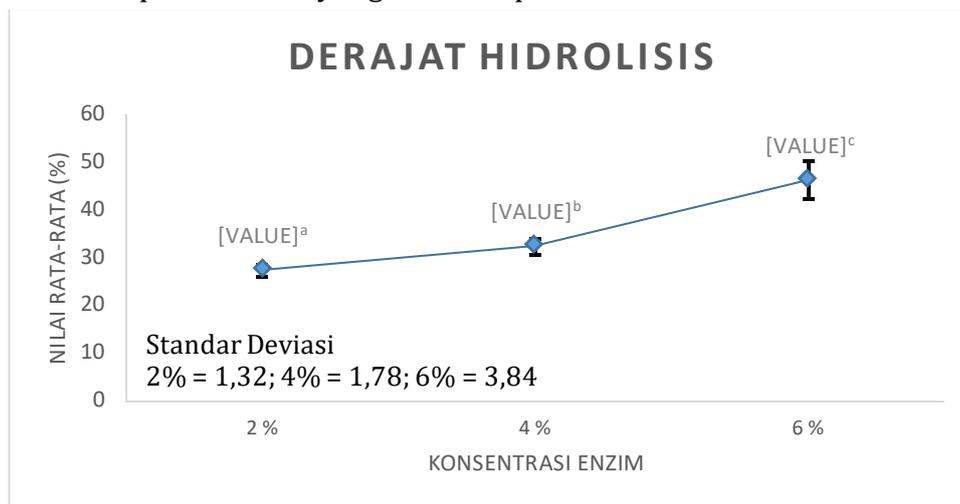
Pada Tabel 2 menunjukkan bahwa kadar air yang terdapat pada ikan cunang memiliki nilai yang cukup tinggi. Hasil analisis tersebut menunjukkan bahwa kadar air pada daging ikan cunang yaitu sebesar 73,95% (bk). Bahan baku yang digunakan

dalam bentuk ikan segar dapat menjadi penyebab kadar air daging ikan cunang termasuk tinggi.

Kadar abu daging ikan cunang yang dihasilkan adalah sebesar 15,15%. Dalam proses pembakaran bahan dengan menggunakan suhu sebesar 600°C akan menyebabkan terbakarnya bahan organik, tetapi masih terdapat bahan yang tidak

terbakar dan berubah menjadi bentuk abu yaitu bahan anorganik yang terdiri atas berbagai mineral.

Ikan cunang menghasilkan kadar protein yaitu sebesar 73,15. Hal tersebut menunjukkan daging ikan cunang tersebut memiliki kualitas yang cukup baik sebagai bahan baku dalam pembuatan hidrolisat protein ikan.



Gambar 1. Nilai rata-rata derajat hidrolisis pada hidrolisat protein ikan cunang dengan berbagai konsentrasi enzim papain yang berbeda

Kadar lemak yang terdapat pada daging ikan cunang yaitu 1,93%. Perbedaan komposisi yang terdapat pada ikan biasanya berasal dari faktor internal (jenis spesies, kelamin serta umur) dan faktor eksternal (habitat dan ketersediaan pakan).

Derajat Hidrolisis

Analisis derajat hidrolisis dilakukan untuk mengetahui kondisi optimum pada hidrolisat protein ikan. Salah satu faktor yang mempengaruhi besarnya derajat hidrolisis yaitu konsentrasi enzim yang digunakan. Nilai rata-rata yang didapat dari hidrolisat protein ikan cunang dengan berbagai konsentrasi berbeda dapat dilihat pada Gambar 1.

Berdasarkan data pada Gambar 1 menunjukkan bahwa pada enzim konsentrasi 6% merupakan kondisi optimum yang terdapat pada proses hidrolisis protein ikan cunang dengan nilai sebesar 46,23%. Menurut pernyataan Nurhayati *et al.* (2013) apabila konsentrasi enzim yang digunakan semakin tinggi, maka

nilai derajat hidrolisis pada hidrolisat protein juga akan semakin meningkat. Namun nilai tersebut akan cenderung tetap atau tidak adanya perubahan pada konsentrasi tertentu.

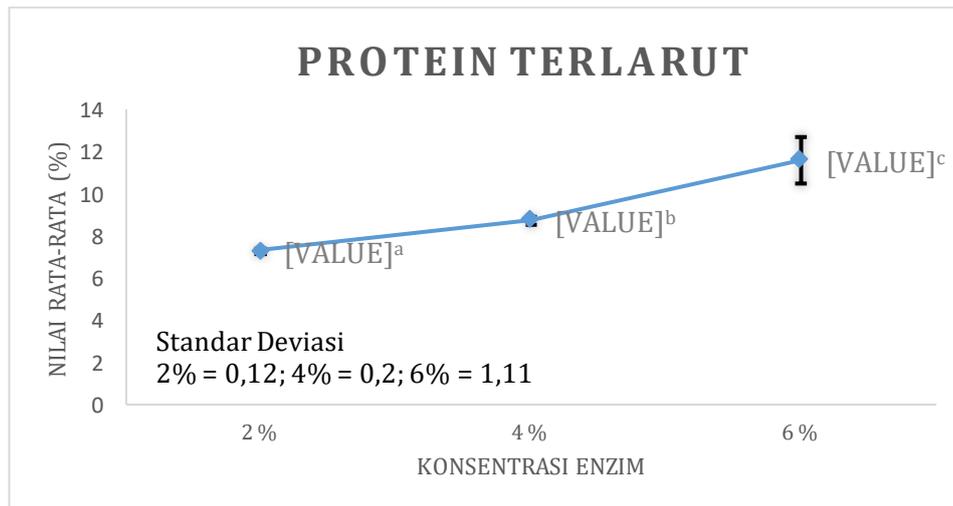
Perbedaan jenis enzim papain mempengaruhi keberlangsungan proses hidrolisis protein ikan, sehingga mengakibatkan perbedaan nilai derajat hidrolisis setiap perlakuan. Menurut Kurniawan *et al.* (2012) hal yang mempengaruhi derajat hidrolisis yaitu jumlah dari asam amino dan senyawa peptida yang berperan sebagai hasil dari pemecahan protein oleh enzim. Karena pengukuran derajat hidrolisis melalui perbandingan nitrogen yang terlarut didalam TCA dengan nitrogen yang terlarut didalam sampel maka nilai derajat hidrolisis tersebut akan semakin tinggi apabila senyawa berantai pendek yang dihasilkan berasal dari semakin tingginya tingkat pemecahan protein (Hasnaliza *et al.* 2010).

Protein Terlarut metode Bradford

Salah satu metode yang digunakan dalam pengukuran protein terlarut pada hidrolisat protein dapat menggunakan metode Bradford. Hasil analisis protein terlarut ikan cunang dengan konsentrasi enzim yang berbeda disajikan pada Gambar 2.

Reaksi antara enzim dengan substrat berpengaruh dalam menentukan kecepatan reaksi hidrolisis. Gambar 2 menunjukkan bahwa konsentrasi enzim mempengaruhi peningkatan terhadap kadar protein terlarut. Protein terlarut tertinggi pada hidrolisat protein ikan cunang terdapat pada konsentrasi enzim 6% yaitu sebesar 11,64%. Hal tersebut membuktikan bahwa kadar

protein terlarut pada hidrolisat protein ikan semakin meningkat apabila semakin banyaknya enzim papain yang digunakan. Semakin meningkatnya protein terlarut tersebut dikarenakan adanya kontribusi dari enzim papain didalam hidrolisat. Murray *et al.* (2003) mengemukakan bahwa konsentrasi enzim berpengaruh terhadap reaksi inisiasi yang akan menentukan kecepatan awal reaksi hidrolisat antara enzim dengan substrat. Semakin terurai struktur protein suatu bahan maka semakin banyak persentasi protein terlarutnya. Semakin tinggi nilai protein terlarut maka semakin tinggi nilai gizi yang akan dicerna dalam tubuh.

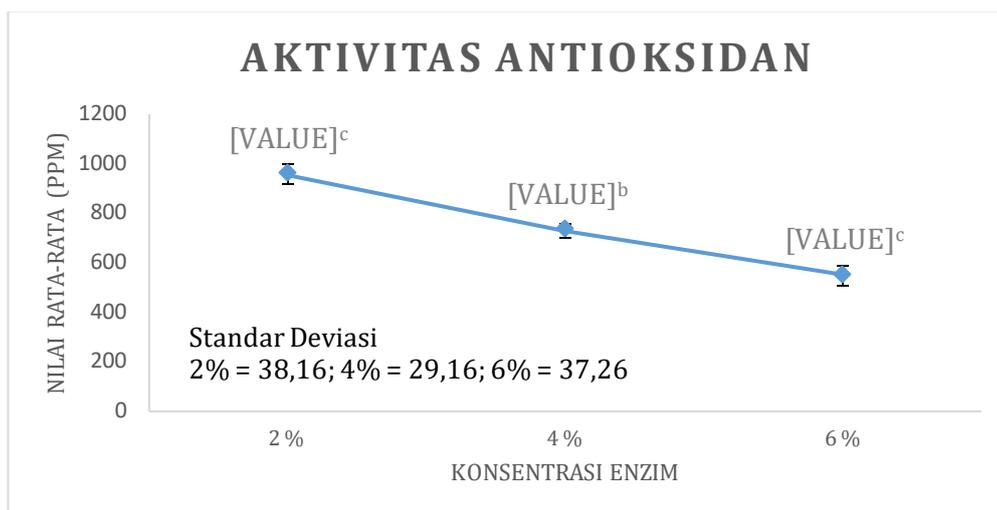


Gambar 2. Nilai rata-rata protein terlarut pada hidrolisat protein ikan cunang dengan berbagai konsentrasi enzim papain yang berbeda

Aktivitas Antioksidan Hidrolisat Protein

Analisis aktivitas anti oksidan hidrolisat protein ikan cunang dilakukan pengujian menggunakan metode DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) dengan konsentrasi 1000, 500, 250, 125 serta 62,5 ppm. Hasil pengujian tersebut dihasilkan hubungan antara konsentrasi hidrolisat protein ikan yang digunakan dengan persen inhibisi. Penentuan besar konsentrasi yang menghambat radikal bebas sebanyak 50% dinyatakan dalam nilai IC₅₀. Hasil dari pengujian aktivitas antioksidan disajikan pada Gambar 3.

Semakin rendah nilai IC₅₀ yang terkandung, maka aktivitas antioksidan akan semakin kuat. Antioksidan dapat dikategorikan kuat apabila memiliki nilai IC₅₀ sebesar <50 ppm, kuat apabila memiliki nilai 50-100 ppm, sedang apabila memiliki nilai 101-250 ppm, lemah apabila memiliki nilai sebesar 251-500 ppm, dan sangat lemah/tidak aktif apabila memiliki nilai > 500 ppm (Jacob *et al.* 2011).



Gambar 3. Nilai rata-rata IC₅₀ pada hidrolisat protein ikan cunang dengan berbagai konsentrasi enzim papain yang berbeda

Berdasarkan pernyataan tersebut, aktivitas antioksidan hidrolisat protein ikan cunang tergolong sangat lemah pada setiap perlakuan konsentrasi, dikarenakan nilai aktivitas antioksidan terbaik pada konsentrasi 6% yaitu sebesar 549,16 ppm. Hal ini kemungkinan disebabkan karena kurangnya waktu dalam proses pemanasan hasil hidrolisis yang mengakibatkan enzim yang terdapat pada hidrolisat kurang bekerja.

Pada Gambar 3 menunjukkan bahwa perlakuan perbedaan antara konsentrasi enzim papain yang digunakan menghasilkan nilai IC₅₀ yang berbeda. Perbedaan ini menunjukkan adanya hubungan pada saat proses hidrolisis antara konsentrasi enzim dengan aktivitas antioksidan. Jumlah asam amino bebas dan peptida akan mengalami peningkatan apabila sejalan dengan meningkatnya konsentrasi enzim yang digunakan. Nilai antioksidan yang dikarenakan adanya peningkatan dari asam amino bebas serta jumlah peptida pada hidrolisat (Baehaki *et al.* 2015).

Berdasarkan hasil hidrolisis yang didapat pada Gambar 1 menunjukkan bahwa derajat hidrolisis pada hidrolisat protein ikan cunang semakin naik dan sejalan dengan hasil antioksidan yang didapat, yaitu hasil dari nilai IC₅₀ pada enzim 6% menandakan aktivitas antioksidan hidrolisat protein ikan cunang semakin tinggi. Hasil tersebut juga sejalan dengan kadar protein

terlarut yang didapatkan, dimana kadar protein terlarut terbaik terdapat pada konsentrasi enzim 6%.

KESIMPULAN

Kesimpulan dari penelitian ini menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan tertinggi pada hidrolisat protein ikan cunang terdapat pada konsentrasi enzim papain 6% yang memiliki nilai IC₅₀ sebesar 549,16 ppm. Nilai tersebut menandakan bahwa aktivitas antioksidan yang terdapat pada hidrolisat protein ikan cunang masih tergolong sangat lemah.

DAFTAR PUSTAKA

- Amiza MA, Kong YL, Faazaz AL. 2012. Effect of hydrolysis on physicochemical properties of cobia (*Rachycentron canadum*) frame hydrolysate. *International Food Research Journal*. 19(1): 199-206.
- [AOAC] Association of Official Analytical Chemists. 2005. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 18th Edition. Gaithersburg: AOAC International.
- Baehaki A. 2015. Hidrolisis protein ikan patin menggunakan enzim papain dan aktivitas antioksidan hidrolisatnya. *JPHPI*. 18(3): 230-239.
- Bradford MM. 1976. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the

- principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 284-254.
- Hasnaliza H. 2010. The effects of enzyme concentration, temperature, and incubation time on nitrogen content and degree of hydrolysis of protein precipitate from cockle (*Anadara granosa*) meat wash water. *International Food Research Journal.* 17: 147-152.
- Jacob M, Purwaningsih S, dan Rinto. 2011. Anatomi, komponen bioaktif dan aktivitas antioksidan daun mangrove api-api (*Avicenia marina*). *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia.* 14(2): 141-150.
- Kurniawan S, Lestari, dan Hanggita SRJ. 2012. Hidrolisat protein tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.) dengan enzim papain. *Fishtech.* 1(1): 41-54
- Kirk RE and Othmer DF. 1953. *Encyclopedia of Chemical Technology, Volume 11.* The Interscience Publ. Inc, New York.
- Laksono UT, Nurhayati T, Suptijah P, Nur'aenah N, Nugroho TS. 2019. Karakteristik ikan malong (*Muraenesox cinerus*) sebagai bahan baku pengembangan produk diversifikasi. *JPHPI.* 22 (1): 60-10.
- Johnson AH dan Peterson MS. 1974. *Encyclopedia of Food Technology, Volume II.* The AVI Publ.Co.Inc, Westport.
- Murray RK, Granner DK, Mayes PA dan Rodwell VW. 2003. Biokimia Harper. Penerbit Buku Kedokteran EGC, ed 25, Jakarta.
- Nurhayati T, Salamah E dan Hidayat T. 2007. Karakteristik hidrolisat protein ikan selar (*Caranx leptolepis*) yang diproses secara enzimatis. *Buletin Teknologi Hasil Perikanan.* 10 (1): 23-34.
- Pasupuleti VK and Demain AL. 2010. *Protein Hydrolysates in Biotechnology.* Springer, New York.
- Sadeli RA. 2016. Uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) ekstrak bromelain buah nanas (*Ananas comosus (L.) Merr.*) [skripsi]. Universitas Sanata Dharma, New York.
- Satapoomin U. 2011. The fishes of southwestern Thailand, the Andaman sea, a review of research and a provisional checklist of species. *Journal Phuket marine biological Center Res. Bull.* 70: 29-77.
- Samarayanaka AGP and Li-Chan EY. 2011. Food-Derived Peptidic Antioxidants: A review of their reproduction, assesment, and potential application. *Journal Functional Foods.* 3: 229-254.
- Zusfahair, Dian RN, Febrina NH. 2014. Karakterisasi papain dari daun pepaya (*Carica Papaya L.*). *J. Molekul.* 9(1): 44-55.