

KARAKTERISASI PEPSIN LAMBUNG IKAN TUNA SIRIP KUNING (*Thunnus albacares*) YANG DIKERINGKAN DENGAN METODE BERBEDA

Tati Nurhayati*, Uju, Jessica Shinta Uli Simangunsong

Departemen Teknologi Hasil Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor,
Kampus IPB Darmaga, Jalan Agatis, Bogor Jawa Barat 16680

Diterima: 14 November 2021/Disetujui: 22 April 2022

*Korespondensi: nurhayati7870@yahoo.com

Cara sitasi: Nurhayati T, Uju, Simangunsong JSU. 2022. Karakterisasi pepsin lambung ikan tuna sirip kuning (*Thunnus albacares*) yang dikeringkan dengan metode berbeda. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 25(1): 163-175.

Abstrak

Pepsin merupakan enzim proteolitik yang aktif dalam kondisi asam. Selama ini pepsin dihasilkan dari lambung babi dan sapi. Bahan baku alternatif penghasil pepsin adalah lambung ikan tuna sirip kuning. Enzim dalam bentuk kering (*powder*) akan lebih mudah dalam penyimpanan dan bersifat stabil. Tujuan penelitian ini menganalisis karakteristik pepsin dari lambung tuna sirip kuning dan pengaruh metode pengeringan terhadap karakteristik pepsin tersebut. Metode pengeringan yang digunakan yaitu *spray drying* dan *freeze drying*. Aktivitas spesifik ekstrak kasar pepsin 19.982,52 U/mg, dengan V_{maks} 50.000 mmol/s dan K_m 0,5 mM. Pepsin optimum pada suhu 50°C dan pH 2, serta memiliki bobot molekul 32 kDa. Pepsin hasil *spray dryer* memiliki aktivitas spesifik 7.693,5 U/mg, serta nilai V_{maks} 833,33 mmol/s dan K_m 0,5 mM, sedangkan hasil *freeze dryer* memiliki aktivitas spesifik 8.606,75 U/mg, serta nilai V_{maks} dan K_m berturut-turut 1.666,67 mmol/s dan 0,833 mM. Bobot molekul pepsin hasil pengeringan *spray dryer* 33 kDa dan *freeze dryer* 33 kDa. Hasil penelitian menunjukkan aktivitas spesifik pepsin menurun setelah proses pengeringan.

Kata kunci: aktivitas enzim, pengeringan beku, pengeringan semprot, pepsin

Pepsin Characterization of Yellowfin Tuna Stomach (*Thunnus albacares*) Dried with Different Methods

Abstract

Pepsin is a proteolytic enzyme that has the ability active in acidic conditions. So far, pepsin is produced from the stomachs of pigs and cows. An alternative raw material for producing pepsin is the stomach of yellowfin tuna. Enzymes in dry form (*powder*) will be easier to store and are stable. The purpose of this study was to analyze the pepsin characteristics of the yellowfin tuna stomach and the effect of the drying method on the pepsin characteristics. The drying method was used *spray drying* and *freeze drying*. The specific activity of pepsin crude extract was 19,982.52 U/mg, with V_{max} 50,000 mmol/s and K_m 0.5 mM. The optimum pepsin at 50°C temperature and pH 2, and has a molecular weight 32 kDa. The dried pepsin with *spray drying* has a specific activity 7,693.5 U/mg, with V_{max} 833.33 mmol/s and K_m 0.5 mM, whereas with *freeze drying* has a specific activity 8,606.75 U/mg, V_{max} and K_m values respectively 1,666.67 mmol/s and 0.833 mM. The molecular weight of pepsin enzyme with *spray drying* 33 kDa and *freeze drying* 33 kDa. The results showed the specific activity of pepsin decreased after the drying process.

Keywords: enzyme activity, freeze drying, pepsin, spray drying

PENDAHULUAN

Sumber daya perikanan yang memiliki potensi besar di Indonesia salah satunya dari kelompok ikan pelagis besar, yaitu ikan tuna (Firdaus 2018). Ikan tuna (*Thunnus* sp.) merupakan hasil perikanan tangkap yang memiliki nilai ekonomis penting di dunia, sehingga permintaan pasar terhadap ikan tuna terus meningkat setiap tahun. Ekspor ikan tuna berdasarkan BPS (2018) mengalami peningkatan setiap tahunnya, yaitu pada tahun 2010 sebesar 67.682,5 ton menjadi 77.465,3 ton pada tahun 2015.

Industri perikanan tuna, terutama di Indonesia sebagian besar hanya memanfaatkan bagian daging saja, sedangkan sisanya merupakan hasil samping, misalnya, kepala, tulang, sirip, dan jeroan yang saat ini kurang dimanfaatkan secara maksimal. Sayana dan Sirajudheen (2017) menyatakan bahwa sebesar 36% dari total keseluruhan ikan tuna merupakan hasil samping meliputi kepala 17%, kulit 8%, jeroan 5%, tulang 4%, sirip 2% dan sebanyak 3,2% dari total keseluruhan jeroan tuna merupakan lambung (Moniharapon dan Pattipeilohy 2016). Total hasil samping dari industri perikanan sebesar 25-30% atau sekitar 3,6 juta ton per tahun (KKP 2007).

Jeroan ikan tuna dapat dimanfaatkan menjadi suatu produk, sehingga dapat meningkatkan nilai tambah, misalnya dalam pembuatan biodiesel (Fauzi 2014), pembuatan pupuk (Giyatmi dan Irianto 2017), pembuatan protein hidrolisat untuk formula pakan ikan lele (Nugroho *et al.* 2019), sediaan enzim protease (Riyanto *et al.* 2012), serta dapat diolah menjadi sediaan pepsin (Pasaribu *et al.* 2018).

Pepsin merupakan salah satu enzim protease yang dapat digunakan untuk mempercepat reaksi hidrolisis protein menjadi asam amino dan peptida yang lebih kecil dalam kondisi asam. Pepsin umumnya digunakan dalam bidang industri, misalnya dalam pembuatan kolagen, obat untuk penyakit lambung, pembuatan keju, serta produksi silase ikan (Zhao *et al.* 2011). Bahan baku pembuatan enzim, terutama pepsin banyak yang berasal dari babi, hal tersebut sangat berkaitan dengan kehalalannya di

Indonesia. Bahan baku lain yang dapat digunakan untuk menghasilkan pepsin adalah lambung ikan, salah satunya lambung ikan tuna. Lambung ikan tuna dapat dimanfaatkan untuk menghasilkan pepsin melalui proses ekstraksi. Pasaribu *et al.* (2018) telah memanfaatkan lambung tuna sirip kuning sebagai bahan baku pepsin karena termasuk salah satu sumber protease, sumber peptida, serta asam amino yang baik, dan memperoleh nilai aktivitas sebesar 0,127 U/mL. Sholeh *et al.* (2020) menggunakan lambung dari ikan tuna sirip kuning (*Thunnus albacares*), cakalang (*Katsuwonus pelamis*), hiu cucut (*Hemigaleus balfouri*), dan tongkol (*Euthynnus affinis*) sebagai bahan baku pembuatan pepsin, nilai aktivitas terbesar diperoleh dari lambung hiu cucut dan tuna sirip kuning sebesar 44.582,07 U/mg dan 10.879,99 U/mg. Pepsin disintesis dalam kelenjar mukosa lambung ikan dalam bentuk zimogen sebagai pepsinogen (Haard 1994). Pepsinogen memiliki berat molekul sebesar 40 kDa dan 44 asam amino tambahan, serta stabil dalam kondisi netral dan alkali lemah (Raufman 2004). Pepsinogen kemudian dapat berubah menjadi pepsin dalam kondisi lingkungan yang asam (Nalinanon *et al.* 2008). Pepsin termasuk ke dalam endopeptidase dan aktif dalam kondisi asam (Gildberg 1988). Pepsin yang memiliki aktivitas tinggi berada pada rentang pH berkisar antara 2-4 (Bougatf *et al.* 2008).

Pengeringan merupakan metode untuk menghilangkan atau mengurangi sebagian air yang terdapat pada suatu bahan atau produk (Riansyah *et al.* 2013). Keuntungan dilakukannya proses pengeringan adalah produk atau bahan yang dikeringkan menjadi awet dan stabil, serta volume produk akan menjadi lebih kecil, sedangkan kekurangannya adalah sifat asli dari produk mengalami perubahan, misalnya perubahan sifat fisik dan kimia, serta dapat terjadi penurunan mutu pada produk (Martunis 2012). Tan *et al.* (2019) telah melakukan mikroenkapsulasi pepsin yang dikeringkan menggunakan *spray dryer*. Hasilnya adalah aktivitas pepsin mengalami penurunan seiring dengan tingginya suhu inlet yang digunakan. Permata *et al.* (2016) yang melakukan pengeringan enzim papain kasar dari getah buah pepaya menggunakan

metode *solar drying*, *cabinet drying*, *vacuum drying*, dan *freeze drying* memperoleh nilai aktivitas proteolitik tertinggi pada metode *vacuum dryer* yaitu ± 50 $\mu\text{g/mL}$. Salleh *et al.* (2014) melaporkan bahwa nilai aktivitas maksimum dari bromelin rekombinan yang dikeringkan dengan *spray dryer* 110°C memiliki aktivitas sebesar $78,08 \pm 0,07$ U/mL. Penelitian mengenai pengeringan pepsin dari lambung tuna sirip kuning menggunakan metode pengeringan semprot (*spray drying*) dan pengeringan beku (*freeze drying*) belum pernah dilaporkan, sehingga perlu dilakukan untuk mengetahui pengaruhnya terhadap aktivitas enzim tersebut.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Bahan utama yang digunakan adalah lambung ikan tuna sirip kuning yang diperoleh dari TPI Gorontalo, Kecamatan Hunthalangi, Kota Gorontalo, Sulawesi Utara. Bahan lain yang digunakan adalah nitrogen cair, es batu, akuades, tris base (Sigma), HCl (Merck), NaHCO_3 (Merck), *bovine hemoglobin* (Sigma), *Trichloroacetic acid* (Merck), *bovine serum albumin* (Sigma), glisin (Merck), asam sitrat (AppliChem), trisodium sitrat (Merck), NaCl (Merck), β -*mercaptoethanol* (β ME) (Merck), *Coomassie Brilliant Blue* (AppliChem), etanol (Merck), metanol (Merck), dan asam asetat (Merck).

Alat yang digunakan di antaranya adalah timbangan analitik (Quattro), spektrofotometer (UV-Vis Genesys 10 Thermo), pH meter (Hanna Instruments), sentrifuge (himac CR 21G), *mini microcentrifuge* (Corning), blender (Phillips), inkubator, mikropipet 1-10 μL , 20-200 μL , dan 200-1000 μL (Thermo Fisher Scientific), penangas air (Bi One), vorteks, *mini spray dryer* (BUCHI 190), *freeze dryer* (Alpha 1-2 LD Plus), dan alat elektroforesis.

Prosedur penelitian

Penelitian terdiri atas tiga tahap. Tahap pertama karakterisasi lambung ikan tuna sirip kuning, tahap kedua ekstraksi dan karakterisasi pepsin, dan tahap ketiga pengeringan pepsin. Setiap tahapan penelitian

dan analisis dilakukan sebanyak dua kali ulangan.

Karakterisasi lambung ikan tuna sirip kuning

Sampel yang digunakan adalah lambung ikan tuna sirip kuning. Lambung tuna dicuci bersih di bawah air mengalir untuk menghilangkan kotoran dan benda asing, kemudian dikemas menggunakan plastik polietilena dan disimpan dalam *freezer* dengan suhu -18°C . Lambung tuna yang telah bersih dilakukan pengukuran morfometrik dan analisis proksimat meliputi kadar air, protein, abu, dan lemak (AOAC 2005).

Ekstraksi dan karakterisasi pepsin lambung tuna sirip kuning

Ekstraksi pepsinogen (Bougatef *et al.* 2008)

Lambung tuna beku dilelehkan terlebih dahulu sebelum dilakukan ekstraksi. Lambung tuna dipotong kecil berukuran 1-1,5 cm lalu ditimbang. Potongan lambung tuna dicelupkan ke dalam nitrogen cair hingga mengeras, kemudian dihaluskan. Lambung tuna yang telah halus diekstraksi menggunakan bufer 10 mM tris-HCl pH 7,5 dengan perbandingan 1:2 (b/v). Sampel yang telah tercampur disentrifugasi selama 15 menit pada 10.000 g pada suhu 4°C . Supernatan yang dihasilkan merupakan ekstrak pepsinogen.

Aktivasi pepsin (Jurado *et al.* 2012)

Aktivasi pepsin dilakukan dengan menurunkan pH pepsinogen menjadi 2 dengan menambahkan HCl 3 N dan dibiarkan selama 10 menit, kemudian ditambahkan NaHCO_3 2 N untuk meningkatkan pH menjadi 2,75. Sampel diendapkan selama 6 jam. Supernatan yang diperoleh berupa larutan pepsin.

Karakterisasi pepsin

Pepsin dikarakterisasi meliputi suhu optimum, pH optimum, kinetika pepsin, dan bobot molekul. Pengujian suhu dan pH optimum mengacu pada Nalinanon *et al.* (2010) menggunakan suhu 20, 30, 40, 50, 60, dan 70°C dan pH 1, 2, 3, 4, 5, dan 6. Kinetika pepsin mengacu pada Zhao *et al.* (2011)

menggunakan konsentrasi substrat 0; 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; dan 4%. Pengujian bobot molekul dilakukan dengan mengacu pada Laemli (1970).

Pengeringan pepsin lambung tuna sirip kuning

Ekstrak kasar pepsin dikeringkan dengan dua metode, yaitu *spray drying* dan *freeze drying*. Enzim yang telah dikeringkan dianalisis aktivitas pepsin (Bougatef *et al.* (2008); Nalinanon *et al.* (2010); Jurado *et al.* (2012)), konsentrasi protein (Bradford 1976), kinetika pepsin (Zhao *et al.* 2011), dan bobot molekul (Laemli 1970).

Metode pertama yang digunakan adalah *spray drying*. Sampel yang masih beku dilakukan proses *thawing* terlebih dahulu menggunakan suhu *chilling* hingga mencair, kemudian larutan sampel berupa ekstrak kasar pepsin sebanyak 250 mL dikeringkan dengan *spray dryer*. Pengeringan yang dilakukan menggunakan suhu inlet 160°C dan suhu outlet 60-70°C dengan tekanan 6 bar. Pepsin yang dihasilkan berbentuk bubuk.

Metode kedua yang digunakan adalah *freeze drying*. Metode ini mengacu pada Elavarasan dan Shamasundar (2015). Ekstrak kasar pepsin sebanyak 500 mL sebelum dikeringkan, dibekukan terlebih dahulu menggunakan *freezer* pada suhu -33°C, kemudian dikeringkan menggunakan *freeze dryer* dengan tekanan 0,0010 mbar selama 72 jam. Pepsin yang dihasilkan berbentuk serpihan.

Analisis Data

Data dianalisis menggunakan metode rancangan acak lengkap (RAL) satu faktor. Uji normalitas dilakukan menggunakan Shapiro-Wilk kemudian dianalisis dengan ANOVA. Jika hasil yang didapatkan berbeda nyata ($p < 0,05$), maka dilanjutkan uji lanjut Duncan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik Lambung Tuna Sirip Kuning

Morfometrik lambung tuna sirip kuning

Lambung ikan tuna yang digunakan masing-masing dilakukan analisis

morfometrik. Analisis morfometrik yang dilakukan meliputi panjang, tebal, diameter, dan bobot lambung. Pengukuran dilakukan menggunakan penggaris dan jangka sorong. Data hasil pengukuran morfometrik lambung ikan tuna sirip kuning dapat dilihat pada *Table 1*.

Table 1 Stomach morphometric of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*)

Parameter	Average
Length (cm)	35.25±1.79
Thick (cm)	0.31±0.06
Diameter (cm)	7.75±1.11
Weight (g)	213.25±19.05

Note: replicate n=8

Lambung yang digunakan dalam penelitian ini tergolong besar. Yunita (2013) menggunakan lambung tuna sirip kuning dengan panjang 14,5-21,2 cm dan bobot lambung 51-184 g.

Lambung tuna berwarna pucat kemerahan, memiliki bentuk seperti kerucut, serta permukaan luar dan dalam yang bertekstur. Lambung berfungsi sebagai tempat menampung dan mencerna makanan. Lambung ikan tuna berukuran besar dan bersifat elastis, sehingga dapat memanjang karena menyesuaikan kebiasaan makan dan jenis makanan yang dimakan. Nuraini *et al.* (2014) menyebutkan bahwa makanan utama ikan tuna yang ditangkap di Perairan Prigi, Kabupaten Trenggalek, Jawa Timur adalah organisme ikan, namun juga ditemukan dalam lambung tuna berisi udang dan cumi-cumi sebagai makanannya. Bentuk dan ukuran lambung setiap jenis ikan berbeda-beda. German *et al.* (2004) dalam penelitiannya menyatakan bahwa ikan karnivora dengan spesies *Xerocomellus atropurpureus* memiliki bentuk lambung seperti tabung, ikan herbivora *Cebidichthys violaceus* hanya memiliki lambung semu, dan ikan omnivora *Anoplarchus purpureus* memiliki lambung yang berbentuk seperti kantong.

Komposisi kimia lambung tuna sirip kuning

Lambung tuna merupakan salah satu hasil

samping yang dapat dijadikan sebagai bahan baku pembuatan enzim protease, yaitu pepsin. Analisis komposisi kimia pada lambung tuna meliputi kadar air, abu, lemak, dan protein. Data hasil analisis komposisi kimia lambung tuna sirip kuning dapat dilihat pada *Table 2*.

Table 2 Chemical composition of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) stomach

Parameter	Average (%)
Moisture	75.36±0.87
Ash	0.41±0.17
Lipid	1.09±0.09
Protein	22.74±1.16

Table 2 menunjukkan bahwa lambung tuna sirip kuning yang digunakan mengandung protein yang sangat tinggi yaitu 22,74%. Kandungan protein lambung tuna yang digunakan dalam penelitian ini lebih tinggi dibandingkan dengan yang digunakan oleh Pasaribu *et al.* (2018) yaitu sebesar 18,96%. Lambung tuna termasuk sebagai salah satu sumber protease karena pada lambung terjadi proses pemecahan protein.

Ekstrak Kasar dan Karakteristik Pepsin Lambung Tuna Sirip Kuning

Hasil interaksi antara perlakuan dengan lama waktu penyimpanan isolat

Total Bakteri *L. monocytogenes*

Pepsinogen merupakan hasil dari proses ekstraksi lambung tuna menggunakan bufer Tris-HCl pH 7,5 dalam bentuk supernatan. Pepsinogen yang dihasilkan memiliki warna kuning kecokelatan. Homogenisasi lambung tuna dengan pelarut bufer berfungsi untuk mengganggu sel mukosa dan memastikan protein yang terlepas larut pada bufer secara merata (Doonan 1996). Lambung tuna dan bufer yang telah homogen diekstraksi hingga menghasilkan pepsinogen, kemudian diaktivasi hingga menjadi ekstrak kasar pepsin. Kenampakan ekstrak kasar pepsin dapat dilihat pada *Figure 1*.

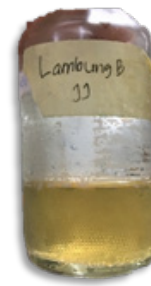


Figure 1 Crude extract of yellowfin tuna stomach pepsin

Aktivitas pepsin lambung tuna sirip kuning

Pepsin yang diperoleh dari lambung tuna memiliki aktivitas spesifik pepsin sebesar 22.173,36 U/mg. Nilai aktivitas pepsin dapat dipengaruhi oleh jenis makanan ikan. Ikan tuna sirip kuning merupakan salah satu jenis ikan karnivora atau pemakan daging. Rakhmawati (2019) memperoleh pepsin dari bandeng yang termasuk ke dalam ikan herbivora sebesar 397 U/mL, serta Yuniasih (2019) memperoleh nilai aktivitas pepsin lambung ikan patin yang merupakan ikan omnivora sebesar 526,5 U/mL. Aktivitas pepsin yang diperoleh dari lambung tuna albakor (*Thunnus alalunga*) dengan bufer natrium fosfat pH 7 yang mengandung 1 mM *phenylmethylsulfonyl flouride* (PMSF) sebesar 1.235 U (Nalinanon *et al.* 2010). Jatmiko (2018) memperoleh nilai aktivitas pepsin lambung tuna sirip kuning yang diekstraksi dengan akuades sebesar 114,05 U/mL, bufer Tris-HCl 123,5 U/mL, dan koagulasi 78,5 U/mL. Zhao *et al.* 2011) menjelaskan bahwa bufer yang paling umum digunakan dalam ekstraksi pepsinogen adalah bufer natrium fosfat, bufer tris-HCl, dan air suling.

Karakteristik pepsin lambung tuna sirip kuning

Suhu optimum pepsin lambung tuna sirip kuning

Suhu optimum merupakan kondisi di mana aktivitas pepsin mencapai nilai tertinggi dan akan mengalami penurunan ketika pepsin bekerja di luar suhu optimum tersebut. Pengukuran suhu optimum dilakukan dengan variasi suhu inkubasi. Aktivitas pepsin pada suhu inkubasi berbeda disajikan pada *Figure 2*

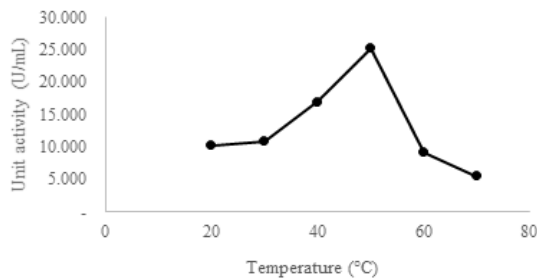


Figure 2 Pepsin activity at different temperatures

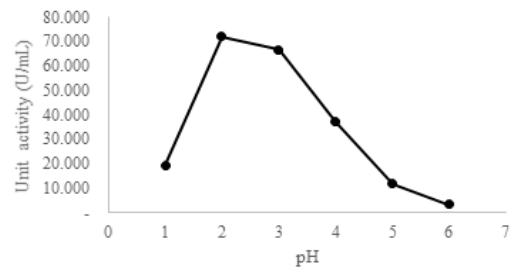


Figure 3 Pepsin activity at different pH

Figure 2 menunjukkan bahwa nilai aktivitas yang dihasilkan pada setiap suhu berbeda. Pepsin lambung tuna sirip kuning optimum pada suhu 50°C. Aktivitas pepsin mengalami peningkatan seiring dengan kenaikan suhu hingga mencapai batas suhu optimum. Hal ini dikarenakan semakin meningkatnya suhu maka akan meningkatkan kecepatan reaksi, sehingga aktivitas enzim akan meningkat. Penurunan nilai aktivitas pepsin terjadi pada suhu 60-70°C karena terjadinya proses denaturasi akibat suhu yang tinggi (Nalinanon *et al.* 2010). Suhu optimum pepsin ikan umumnya berkisar antara 30-55°C (Zhao *et al.* 2011).

Suhu optimum pada setiap pepsin tidak selalu sama. Perbedaan suhu optimum pada pepsin berkaitan dengan perbedaan konformasi enzim yang dipengaruhi oleh habitat dan lingkungan (Gildberg 1988). Ikan yang berasal dari perairan dingin akan memiliki aktivitas yang tinggi pada suhu rendah, sehingga cukup rentan terhadap suhu tinggi. Suhu optimum dari ikan capelin (*Mallotus villosus*) adalah 40°C dan mengalami penurunan aktivitas pada suhu 50°C (Gildberg dan Raa 1983). Hasil penelitian Sholeh *et al.* (2020) dan Pasaribu *et al.* (2018) menunjukkan bahwa pepsin dari tuna sirip kuning stabil pada rentang suhu 40-60°C dan mengalami penurunan pada suhu 70°C. Nalinanon *et al.* (2008) menyatakan bahwa suhu optimum pada tuna albakora (*Thunnus alalunga*), cakalang (*Katsuwonus pelamis*), dan tuna abu-abu (*Thunnus tonggol*) sebesar 50°C

pH optimum pepsin lambung tuna sirip kuning

Pepsin merupakan enzim protease yang aktif dalam kondisi asam. Aktivitas pepsin tidak hanya dipengaruhi oleh suhu, tetapi juga dipengaruhi oleh nilai derajat keasaman atau pH. Pengukuran nilai pH optimum pada pepsin lambung tuna sirip kuning ditentukan pada kisaran pH 1,0-6,0. Hasil pengukuran nilai pH optimum pepsin lambung tuna sirip kuning dapat dilihat pada Figure 3.

Figure 3 menunjukkan nilai aktivitas pepsin pada setiap pH yang berbeda. Nilai pH optimum pepsin lambung tuna sirip kuning berada pada pH 2, namun mengalami penurunan nilai aktivitas pada pH 3 hingga 6. Hasil tersebut sama seperti jenis ikan lainnya, pepsin dari tuna albakora, cakalang, dan tuna abu-abu optimum pada pH 2 (Nalinanon *et al.* 2008). Hasil penelitian Tanji *et al.* (1988) menunjukkan bahwa pepsin ikan tuna sirip biru Pasifik Utara optimum pada pH 2,5.

Aktivitas pepsin akan menurun jika pepsin bekerja di luar pH optimum. Pepsin bekerja pada pH rendah karena termasuk ke dalam salah satu protease yang bekerja menghidrolisis protein dalam kondisi asam (protease asam). Sisi aktif enzim pada kondisi pH optimum sesuai dengan substrat yang digunakan, sehingga akan menghasilkan kompleks enzim substrat yang maksimal (Fathimah dan Wardani 2014). Aktivitas pepsin umumnya menurun pada pH yang lebih tinggi. Hal tersebut dapat disebabkan karena terjadi perubahan konformasi enzim sehingga dapat menurunkan aktivitas (Benjakul *et al.* 2003).

Kinetika pepsin lambung tuna sirip kuning

Aktivitas pepsin dapat dipengaruhi oleh konsentrasi substrat yang digunakan. Aktivitas enzim berkaitan dengan kecepatan reaksi enzim, sehingga semakin tinggi konsentrasi substrat yang digunakan maka aktivitas enzim dan kecepatan reaksi juga akan meningkat (Elawati *et al.* 2018). Kecepatan reaksi enzim dapat diketahui dengan cara menentukan nilai V_{maks} dan K_m menggunakan variasi konsentrasi substrat. Hasil pengujian kinetika ekstrak kasar pepsin menggunakan konsentrasi substrat yang berbeda dapat dilihat pada *Figure 4* dan *Figure 5*.

Figure 4 menunjukkan hubungan antara konsentrasi substrat dengan aktivitas ekstrak kasar pepsin. Hasil tersebut menyatakan bahwa aktivitas pepsin dipengaruhi oleh konsentrasi substrat yang digunakan. Aktivitas enzim terus meningkat pada konsentrasi substrat 0 hingga 2%, namun mengalami penurunan saat melewati konsentrasi 2%. Aktivitas ekstrak kasar pepsin tertinggi pada konsentrasi substrat 2%, yaitu 39.526,67 U/mL.

Konsentrasi substrat yang rendah akan menghasilkan kecepatan reaksi yang rendah juga, namun akan meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi substrat hingga mencapai titik batas atau disebut sebagai kecepatan maksimum (V_{maks}). Kecepatan maksimum tercapai disebabkan karena seluruh sisi aktif enzim telah berikatan dengan substrat (Lehninger 1982).

Figure 5 menunjukkan persamaan Lineweaver-Burk yang digunakan untuk menentukan nilai kecepatan reaksi maksimal

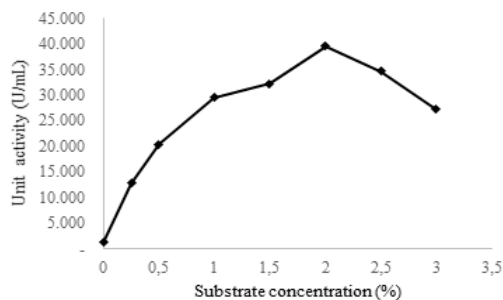


Figure 4 Pepsin crude extract activity at different substrate concentrations

(V_{maks}) dan konstanta Michaelis-Menten (K_m). Ekstrak kasar pepsin menghasilkan nilai V_{maks} sebesar 50.000 mmol/s dan nilai K_m 0,5 mM. V_{maks} merupakan nilai kecepatan reaksi maksimal yang dapat dicapai oleh pepsin, sedangkan nilai K_m merupakan konsentrasi substrat yang diperlukan enzim untuk mencapai setengah kecepatan maksimalnya. Nilai K_m yang diperoleh pada ikan *pectoral rattail* (*Albatrossia pectoralis*) sebesar 0,152 mM (Klomkao *et al.* 2007), pada sidat eropa (*Anguila anguila*) sebesar 0,088 mM (Wu *et al.* 2009), dan ikan gabus (*Channa argus*) sebesar 0,14 mM (Chen *et al.* 2009).

Bobot molekul pepsin lambung tuna sirip kuning

Pengujian bobot molekul pepsinogen, ekstrak kasar pepsin, serta pepsin yang dikeringkan dengan *spray dryer* dan *freeze dryer* dilakukan dengan menggunakan metode SDS-Page. SDS-Page merupakan metode untuk memisahkan rantai polipeptida protein berdasarkan berat molekul dengan menggunakan arus listrik (Jaziri *et al.* 2017). Pengujian bobot molekul ditandai dengan terbentuknya pita pada elektrogram. Hasil pengujian bobot molekul pada ekstrak kasar pepsin dan pepsinogen dapat dilihat pada *Figure 6*.

Figure 6 menunjukkan hasil bobot molekul pada sampel pepsinogen dan ekstrak kasar pepsin. Pita yang terbentuk pada sampel pepsinogen sebanyak sepuluh pita, sedangkan pada sampel ekstrak kasar pepsin sebanyak lima pita. Analisis bobot molekul pepsinogen dan ekstrak kasar pepsin diukur menggunakan *marker* protein yang sudah diketahui bobot molekulnya, yaitu 10-250 kDa.

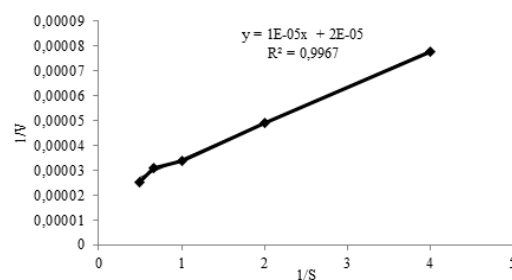


Figure 5 Kinetic of crude extract of pepsin

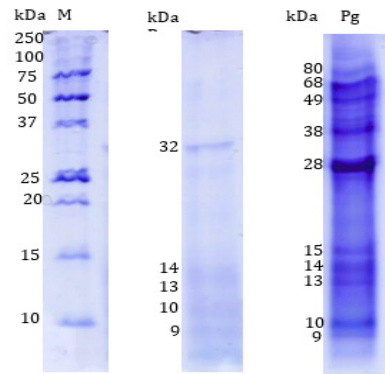


Figure 6 Electrogram SDS PAGE pepsin dan pepsinogen, M: marker, P: pepsin, Pg: pepsinogen

Nilai bobot molekul pada sampel pepsinogen dan ekstrak kasar pepsin lambung tuna sirip kuning. Bobot molekul yang diperoleh pada sampel pepsinogen sebesar 38 kDa, serta pada ekstrak kasar pepsin sebesar 32 kDa. Bobot molekul yang diperoleh dari beberapa peneliti juga berada pada kisaran yang hampir sama. Nalinanon *et al.* (2010) memperoleh bobot molekul pepsinogen dan pepsin dari ikan tuna albakor (*T. alalunga*) berturut-turut sebesar 39,90 kDa dan 32,70 kDa. Bougatef *et al.* (2008) memperoleh bobot molekul pepsinogen sebesar 40 kDa dan pepsin sebesar 35 kDa pada sampel ikan hiu *smooth hound* (*Mustelus mustelus*).

Pepsin Kering Lambung Tuna Sirip Kuning

Ekstrak kasar pepsin yang dihasilkan kemudian dilakukan proses pengeringan menggunakan dua metode yang berbeda, yaitu *spray drying* dan *freeze drying*. *Spray drying* dilakukan menggunakan suhu inlet 160°C dan suhu outlet 60-70°C, sedangkan *freeze drying* menggunakan suhu -33°C. Kenampakan pepsin hasil pengeringan dapat dilihat pada *Figure 7*.

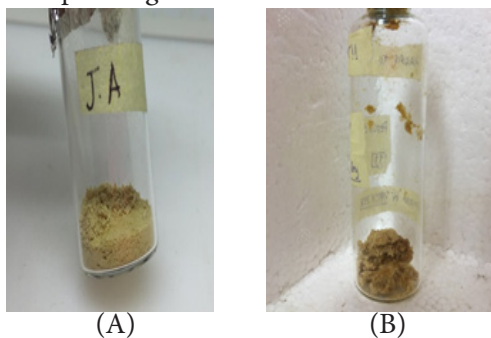


Figure 7 Pepsin powder; (A) spray drying, (B) freeze drying

Rendemen pepsin kering

Pepsin kering yang dihasilkan dari proses pengeringan dilakukan pengukuran rendemen. Rendemen yang diperoleh pepsin hasil pengeringan *spray dryer* sebesar $0,44 \pm 0,31\%$, sedangkan untuk pepsin hasil pengeringan *freeze dryer* $0,89 \pm 0,36\%$. Hasil tersebut menunjukkan bahwa rendemen pepsin hasil pengeringan *freeze dryer* lebih tinggi dibandingkan dengan *spray dryer*. Wilkowska *et al.* (2016) menyatakan bahwa rendahnya rendemen yang dihasilkan dari pengeringan semprot dapat disebabkan karena hanya sebagian bubuk yang dikirimkan ke wadah penerima, sementara sebagian bubuk yang lain tertinggal dan menempel pada siklon.

Perbandingan aktivitas ekstrak kasar pepsin dan pepsin kering

Ekstrak kasar pepsin tuna pada produksi kedua dilakukan pengujian aktivitas, kemudian dilakukan tahapan pengeringan menggunakan *spray dryer* dan *freeze dryer*. Tahapan pengeringan yang dilakukan memberikan nilai aktivitas yang berbeda dengan ekstrak kasar pepsin. Hasil pengujian aktivitas pada ekstrak kasar pepsin dan pepsin yang dikeringkan dengan *spray dryer* dan *freeze dryer* dapat dilihat pada *Figure 8*.

Hasil ANOVA menunjukkan bahwa aktivitas pepsin setelah pengeringan mengalami penurunan yang signifikan ($\alpha=0,05$). Penurunan aktivitasnya sebesar 73,2% (*spray dryer*) dan 57,93% (*freeze dryer*). Penurunan aktivitas pepsin setelah pengeringan disebabkan oleh terjadinya denaturasi akibat penggunaan suhu tinggi

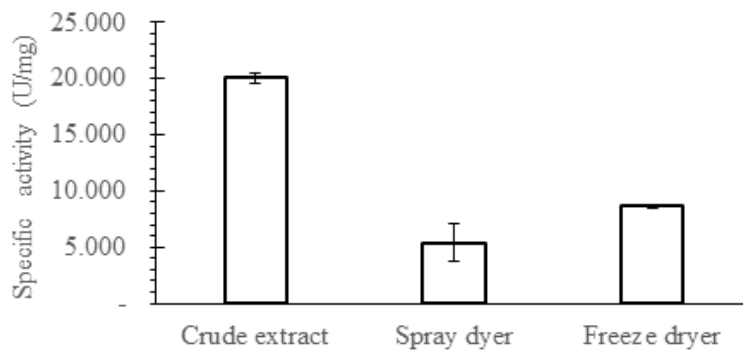


Figure 8 Activity of crude pepsin and pepsin dried by spray dryer and freeze dryer

saat pengeringan dengan *spray dryer* dan juga akibat penanganan yang tidak tepat saat pengeringan dengan *freeze dryer*. Tan *et al.* (2019) mengatakan bahwa suhu tinggi yang digunakan saat proses pengeringan dengan *spray dryer* dapat menurunkan tingkat kelangsungan hidup pepsin. de Jesus dan Filho (2014) mengatakan bahwa suhu *inlet* dan *outlet* yang rendah dapat mencegah hilangnya aktivitas enzimatis dari α -amilase. Peningkatan suhu *inlet* dapat menyebabkan suhu *outlet* ikut meningkat, karena terjadi peningkatan energi panas. Pada pengeringan beku, pembekuan yang dilakukan dapat menyebabkan perubahan konformasi enzim yang membuat sisi aktif enzim tidak dapat berikatan dengan substrat. Perubahan yang terjadi bersifat *irreversible*, sehingga menyebabkan terjadinya penurunan nilai aktivitas setelah proses sublimasi (Schwimmer 1981). Pembekuan tersebut menyebabkan ikatan sulfhidril (-SH) yang terdapat pada sisi aktif enzim mengalami perubahan menjadi ikatan disulfide (-S-S-) (Muchtadi dan Sugiyono 2013). Sholeh *et al.* (2020)

memperoleh nilai aktivitas spesifik pepsin tuna sirip kuning sebesar 10.879,99 U/mg.

Kinetika pepsin kering

Ekstrak kasar pepsin yang telah melalui proses pengeringan juga dilakukan pengujian kinetika. Pengujian kinetika dilakukan menggunakan variasi konsentrasi substrat. Hasil pengujian kinetika pada pepsin yang dikeringkan dengan *spray dryer* dapat dilihat pada *Figure 9* dan *10*.

Figure 10 menunjukkan hubungan antara aktivitas pepsin kering hasil *spray drying* dengan konsentrasi substrat yang berbeda. Aktivitas tertinggi terdapat pada konsentrasi substrat 2% sebesar 602,53 U/mL. Aktivitas pepsin terus meningkat pada konsentrasi substrat 0-2%.

Kinetika pepsin yang dikeringkan dengan *freeze dryer* dapat dilihat pada *Figure 11* dan *12*. *Figure 13* menunjukkan hubungan antara aktivitas pepsin yang dikeringkan menggunakan metode *freeze drying* dengan konsentrasi substrat. Konsentrasi substrat 2% menghasilkan nilai aktivitas pepsin tertinggi

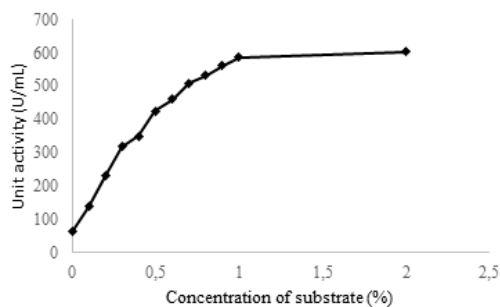


Figure 9 Activity of pepsin powder with spray dryer at different substrat

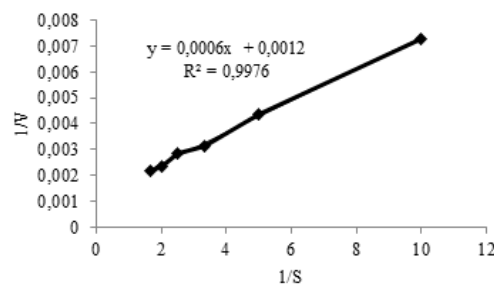


Figure 10 Kinetic of pepsin powder with spray dryer

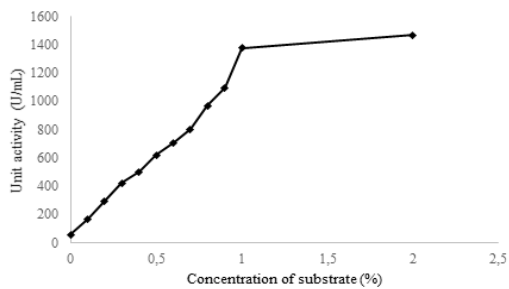


Figure 11 Activity of pepsin powder with freeze dryer at different substrat

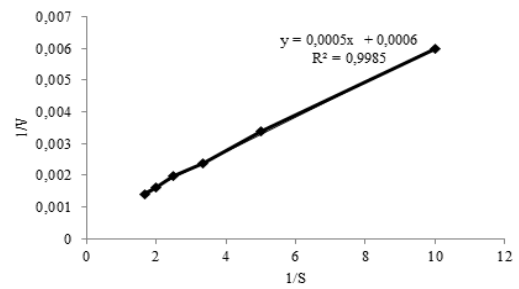


Figure 12 Kinetic of pepsin powder with freeze dryer

yaitu 1.469,87 U/mL. Peningkatan aktivitas pepsin terus terjadi hingga 2%.

Peningkatan nilai aktivitas yang terjadi pada *Figure 10* dan *Figure 12* menunjukkan adanya peningkatan kecepatan reaksi pada enzim. Nilai V_{maks} dan K_m pepsin yang dikeringkan dengan *spray dryer* sebesar 833,33 mmol/s dan 0,5 mM (*Figure 10*), sedangkan pada pepsin yang dikeringkan dengan *freeze dryer* memperoleh nilai V_{maks} dan K_m sebesar 1.666,667 mmol/s dan 0,833 mM (*Figure 12*). Nilai K_m yang dihasilkan ekstrak kasar pepsin dengan pepsin kering hasil pengeringan *spray dryer* dan *freeze dryer* tidak berbeda jauh. Nilai K_m pada pepsin berbeda-beda. Semakin kecil nilai K_m yang dihasilkan maka afinitas enzim terhadap substrat semakin besar sehingga kompleks enzim-substrat semakin baik (Saropah *et al.* 2012).

Bobot molekul pepsin lambung tuna sirip kuning

Ekstrak kasar pepsin yang telah dikeringkan dengan *spray dryer* dan *freeze dryer* diuji bobot molekulnya menggunakan metode SDS-Page. Hasil pengujian bobot molekul pada pepsin kering dapat dilihat pada *Figure 13*.

Figure 13 menunjukkan jumlah pita sampel pepsin kering yang terbentuk pada elektrogram. Pepsin yang dikeringkan dengan *spray dryer* (Psd) dan *freeze dryer* (Pfd) masing-masing membentuk tiga pita. Pita yang terbentuk pada elektrogram akan semakin tebal jika konsentrasi protein sampel yang dielektroforesis semakin tinggi (Wibowo *et al.* 2012). Analisis bobot molekul pepsin kering diukur menggunakan marker protein yang sudah diketahui bobot molekulnya, yaitu 10-250 kDa.

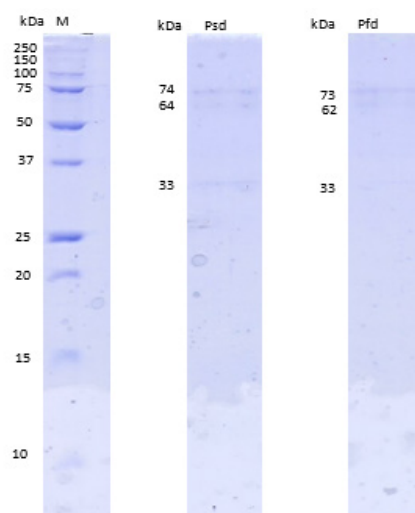


Figure 13 Electrogram of pepsin powder (Psd= pepsin powder by spray dryer, Pfd=pepsin powder by freeze dryer) M: Marker, Psd: Pepsin spray dryer, Pfd: Pepsin freeze dryer

Nilai bobot molekul pada pepsin lambung tuna sirip kuning kering hasil pengeringan *spray dryer* dan *freeze dryer*. Bobot molekul yang dihasilkan pepsin kering relatif tidak mengalami perubahan yang signifikan bila dibandingkan dengan ekstrak kasar pepsin sebelum dikeringkan. Ini menunjukkan bahwa molekul pepsin tidak mengalami degradasi akibat pengeringan dengan *spray dryer* maupun *freeze dryer*. Namun mengalami penurunan terhadap aktivitasnya akibat perubahan konformasi molekul pepsin. Bobot molekul pepsin kering hasil pengeringan *spray dryer* dan *freeze dryer* masing-masing sebesar 33 kDa dan 33 kDa. Zhao *et al.* (2011) menyatakan bahwa pepsin memiliki berat molekul 36 kDa.

KESIMPULAN

Pepsin dari lambung tuna sirip kuning memiliki aktivitas spesifik 22.173,36 U/mg. Pepsin optimum pada suhu 50°C dan kondisi lingkungan asam, yaitu pH 2, serta pada konsentrasi substrat 2%. Bobot molekul yang dihasilkan ekstrak kasar pepsin sebesar 32 kDa. Proses pengeringan menggunakan metode *spray dryer* dan *freeze dryer* dapat menurunkan nilai aktivitas pepsin sebesar 73,2% (*spray dryer*) dan 57,93% (*freeze dryer*).

Penurunan yang signifikan terhadap aktivitas pepsin setelah dikeringkan optimasi terhadap operasional kedua alat pengering tersebut dan juga metode mikroenkapsulasi terhadap pepsin yang akan dikeringkan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi Republik Indonesia melalui PTUPT tahun 2020 atas nama Prof. Dr. Tati Nurhayati, SPi, MSi.

DAFTAR PUSTAKA

[AOAC] Assosiation of Analytical Chemist. 2005. Official Method of Analysis of The Assosiation of Official Analitical Chemist. Arlington (US): The Assosiation of Official Analitical Chemist Inc.

Benjakul S, Visessanguan W, Tanaka M. 2003. Partial purification and characterization of trimethylamine-N-oxide demethylase

from lizardfish kidney. *Comparative biochemistry and physiology part B: biochemistry and molecular biology*. 135(2):359-371.

Bougatef A, Balti R, Zaeid SB, Souissi N, Nasri M. 2008. Pepsinogen and pepsin from the stomach of smooth hound (*Mustelus mustelus*): Purification, characterization, and amino acid terminal sequences. *Food Chemistry*. 107:777-784.

[BPS] Badan Pusat Statistika. 2018. *Statistik Ekspor Tuna menurut Negara Tujuan Utama*. Jakarta (ID): Pusat Data, Statistik, dan Informasi Sekretariat Jenderal, Kementerian Kelautan dan Perikanan.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for qualification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72:234-254.

[BSN] Badan Standardisasi Nasional. 1992. *Cara Uji Makanan dan Minuman. SNI 1-2891-1992*. Jakarta(ID):Badan Standardisasi Nasional.

Chen WQ, Cao MJ, Yoshida A, Liu GM, Weng WY, Sun LC, Su WJ. 2009. Study on pepsinogens and pepsins from snakehead (*Channa argus*). *Journal Agrucultural Food Chemistry*. 5:10972-10978.

De Jesus SS, Filho RM. 2014. Drying of α -amylase by spray drying and freeze drying-a comparative study. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 31(3): 625-631.

Doonan S. 1996. Preparation of extracts from animal tissues. *Methods in Molecular Biology*. 59: 17-22.

Elavarasan K, Shamasundar BA. 2015. Effect of oven drying and freeze drying on the antioxidant and functional properties of protein hydrolysates derived from freshwater fish (*Cirrhinus mrigala*) using papain enzyme. *Journal Food Science Technology*. 53(2):1303-1311.

Elawati NE, Pujiyanto S, Kusdiyantini E. 2018. Karakteristik dan sifat kinetika enzim kitinase asal jamur entomopatogen *Beauveria bassiana*. *Jurnal Bioteknologi dan Biosains Indonesia*. 5(1):1-7.

Fathimah AN, Wardani AK. 2014. Ekstraksi dan karakterisasi enzim protease dari

- daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk.). *Jurnal Teknologi Pertanian*. 15(3):191-200.
- Fauzi RL. 2014. Pembuatan biodiesel dari jeroan tuna sirip kuning menggunakan katalis CaO dengan metode transesterifikasi bertingkat [Skripsi]. Yogyakarta (ID): Universitas Gadjah Madah.
- Firdaus M. 2018. Profil perikanan tuna dan cakalang di Indonesia. *Marina*. 4(1):23-32.
- German DP, Horn MH, Gawlicka A. 2004. Digestive enzyme activities in herbivorous and carnivorous prickleback fishes (Teleostei: Stichaeidae): Ontogenic, dietary, and phylogenetic effects. *Physiological and Biochemical Zoology*. 77(5): 789-804.
- Gildberg A, Raa J. 1983. Purification and characterization of pepsins from the arctic fish capelin (*Mallotus villosus*). *comparative biochemistry and physiology part A: Physiology*. 75(3):337-342.
- Gildberg A. 1988. Aspartic proteinases in fishes and aquatic invertebrates. *Comparative biochemistry and physiology part B: comparative biochemistry*. 91(3):425-435.
- Giyatmi, Irianto HE. 2017. Enzymes in fermented fish. *Advances in Food and Nutrition Research*. 80:199-216.
- Haard NF. 1994. *Protein Hydrolysis In Seafoods. Seafoods: Chemistry, Processing Technology and Quality*. Glasgow (UK): Blackie Academic and Professional.
- Jatmiko PD. 2018. Karakteristik ekstrak kasar pepsin ikan tuna sirip kuning (*Thunnus albacares*) [Skripsi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Jaziri AA, Sukoso, Firdaus M. 2017. Karakteristik protease dari ekstrak kasar khamir laut dan aktivitasnya dalam menghidrolisis protein ikan rucah. *Journal of Fisheries and Marine Science*. 1(2): 78-87.
- Jurado E, Vicaria JM, Lechuga M, Moya-Ramirez I. 2012. Pepsin extraction process from swine wastes. *Procedia Engineering*. 42: 1346-1350.
- [KKP] Kementerian Kelautan dan Perikanan. 2007. *Indonesian Fisheries Statistics Index 2006*. Jakarta (ID): Kementerian Kelautan dan Perikanan.
- Klomklao S, Kishimura H, Yabe M, Benjakul S. 2007. Purification and characterization of two pepsins from the stomach of pectoral rattail (*Coryphaenoides pectoralis*). *Comparative biochemistry and physiology*. 147B(4):682-689.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227(10): 680-685.
- Lehninger AL. 1982. *Dasar-Dasar Biokimia Jilid 1* (Terjemahan Maggy Thenawidjaja). Jakarta (ID): Erlangga.
- Martunis. 2012. Pengaruh suhu dan lama pengeringan terhadap kuantitas dan kualitas pati kentang varietas Granola. *Jurnal Teknologi dan Industri Pertanian Indonesia*. 4(3):26-30.
- Mattjik AA, Sumertajaya M. 2002. *Rancangan Percobaan dengan Aplikasi SAS dan Minitab Jilid 1*. Ed ke-2. Bogor (ID): IPB Press.
- Moniharapon T, Pattipeilohy F. 2016. Pemanfaatan daging merah dari limbah tuna loin dalam pengolahan kecap ikan. *Majalah Biam*. 12(1):27-31.
- Muchtadi TR, Sugiyono. 2013. *Prinsip Proses dan Teknologi Pangan*. Bandung (ID): Alfabeta.
- Nalinanon S, Benjakul S, Kishimura H. 2010. Biochemical properties of pepsinogen and pepsin from the stomach of albacore tuna (*Thunnus alalunga*). *Food Chemistry*. 121(1):49-55.
- Nalinanon S, Benjakul S, Visessanguan W, Kishimura H. 2008. Tuna pepsin: characteristics and its use for collagen extraction from the skin of threadfin bream (*Nemipterus* spp.). *Journal of Food Sciences*. 73(5): 413-419.
- Nugroho GA, Ekawati AW, Kartikaningsih H. 2019. Hydrolyzate protein tuna (*Thunnus* sp.) viscera as an alternative material for catfish (*Clarias gariepinus*) feed formula. *International Journal of Scientific and Technology Research*. 8(12):3836-3839.
- Nuraini AF, Santoso A, Redjeki S. 2014. Morfometrik dan komposisi isi lambung ikan tuna sirip kuning (*Thunnus albacares*) yang didaratkan di Pantai Prigi

- Jawa Timur. *Journal of Marine Research*. 3(2): 86-90.
- Permata DA, Ikhwan H, Aisman. 2016. Aktivitas proteolitik papain kasar getah buah pepaya dengan berbagai metode pengeringan. *Jurnal Teknologi Pertanian Andalas*. 20(2):58-64.
- Raufman J. 2004. Pepsin. In *Encyclopedia of Gastroenterology*. Amsterdam(NL): Johnson LR, Ed, Academic Press.
- Rakhmawati IAI. 2019. Karakteristik ekstrak kasar pepsin dari lambung ikan bandeng (*Chanos chanos*) [Skripsi]. Bogor(ID): Institut Pertanian Bogor.
- Riansyah A, Supriadi A, Nopianti R. 2013. Pengaruh perbedaan suhu dan waktu pengeringan terhadap karakteristik ikan asin sepat siam (*Trichogaster pectoralis*) dengan menggunakan oven. *Fishtech*. 2(1):53-68.
- Riyanto B, Uju, Halimi S. 2012. Recovery enzim protease dari jeroan ikan tuna dengan teknologi ultrafiltrasi dan reverse osmosis. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 15(2):110-118.
- Roberts EOS, Knorr D. 2009. The protective effect of monosodium glutamate on survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus rhamnosus* E-97800 (E800) strains during spray drying and storage in trehalose-containing powders. *International Dairy Journal*. 19:209-214.
- Salleh HM, Mel M, Jami MS, Amid A, Bala M. 2014. Optimization of spray drying process conditions for recombinant stem bromelain. *Advances in Environmental Biology*. 8(3):696-703.
- Saropah DA, Jannah A, Maunatin A. 2012. Kinetika reaksi enzimatik ekstrak kasar enzim selulase bakteri selulolitik hasil isolasi dari bekatul. *Alchemy*. 2(1):34-45.
- Sayana KS, Sirajudheen TK. 2017. By-products from tuna processing wastes an economic approach to coastal waste management. *Proceedings of the International Seminar on Coastal Biodiversity Assessment*. 411-420.
- Schwimmer S. 1981. *Source Book of Food Enzymology (Quellenbuch der Lebensmittel-Enzymologie)*. Connecticut (USA): The AVI Publishing Company.
- Sholeh MM, Ambarsari L, Nurcholis W, Nurhayati T. 2020. Characterization of ammonium sulphate fraction of pepsin from fish stomach. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 404.
- Tan S, Zhong C, Langrish T. 2019. Microencapsulation of pepsin in the spray dried WPI (whey protein isolates) matrices for controlled release. *Journal of Food Engineering*. 263:147-154.
- Tanji M, Kageyama T, Takahashi K. 1988. Tuna pepsinogens and pepsins. Purification, characterization and amino-terminal sequences. *European Journal of Biochemistry*. 177(2):251-259.
- Wibowo AD, Suhartono MT, Siagian PLP. 2012. Fraksionasi dan penentuan profil protein bungkil kelapa dengan SDS-Page. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*. 23(1):69-74.
- Wilkowska A, Ambroziak W, Czyzowska A, Adamiec J. 2016. Effect of microencapsulation by spray drying and freeze drying technique on the antioxidant properties of blueberry (*Vaccinium myrtillus*) juice polyphenolic compounds. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 66(1):11-16.
- Wu T, Sun LC, Du C, Cai QF, Zhang QB, Su WJ, Cao MJ. 2009. Identification of pepsinogens and pepsins from the stomach of European eel (*Anguilla anguilla*). *Food Chemistry*. 115:137-142.
- Yuniasih. 2019. Karakteristik ekstrak kasar pepsinpepsin dari lambung ikan patin (*Pangasius* sp.) [Skripsi]. Bogor(ID): Institut Pertanian Bogor.
- Yunita R. 2013. Analisis isi lambung ikan madidihang (*Thunnus albacares*) yang didaratkan di Pangkalan Pendaratan Ikan (PPI) Ujung Baroh, Meulaboh Aceh Barat [Skripsi]. Aceh(ID): Universitas Teuku Umar.
- Zhao L, Budge SM, Ghaly AE, Brooks MS, Dave D. 2011. Extraction, purification and characterization of fish pepsin: a critical review. *Journal of Food Processing and Technology*. 2(6):1-14.