

KANDUNGAN GIZI DAN ANTIOKSIDAN HIDROLISAT PROTEIN LIMBAH IKAN CAKALANG HASIL OPTIMASI pH, SUHU DAN LAMA HIDROLISIS

Nutritional Content and Antioxidant from Hydrolysate of Skipjack by-products Results of Optimization of pH, Temperature and Hydrolysis Duration

Dwi Yanuar Budi Prasetyo^{1,4}, Tri Winarni Agustini^{2*}, Gemala Anjani³, Putut Har Riyadi²

¹Program Studi Doktor Manajemen Sumber Daya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Diponegoro, Jl. Prof. Jacub Rais, Tembalang, Semarang 50275, Indonesia

²Departemen Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro, Jl. Prof. Jacub Rais, Tembalang, Semarang 50275, Indonesia

³Departemen Ilmu Gizi, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro, Tembalang, Semarang 50275, Indonesia

⁴Program Studi Ilmu Perikanan, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Nahdlatul Ulama Purwokerto, Jl. Sultan Agung no. 42, Banyumas 53145, Indonesia

Email: tagustini@lecturer.undip.ac.id

ABSTRAK

Limbah ikan cakalang seperti kerangka dan hasil *trimming* mengandung senyawa bioaktif sehingga mempunyai potensi untuk diolah menjadi produk pangan fungsional, salah satunya hidrolisat protein ikan (HPI). Penelitian ini bertujuan untuk mendeskripsikan kandungan gizi dan aktivitas antioksidan dari HPI limbah ikan cakalang. Metode pembuatan HPI menggunakan enzim papain (5%) pada pH 6,4, suhu 61°C, dan lama hidrolisis 228 menit. Penentuan derajat hidrolisis menggunakan nitrogen yang terlarut TCA, kadar air dan abu secara gravimetri, kadar protein secara Kjeldahl, kadar lemak menggunakan Soxhlet. Analisis profil asam amino menggunakan HPLC, serta analisis aktivitas antioksidan menggunakan *radical scavenging activity* (RSA) dan *ferric reducing antioxidant power* (FRAP). Nilai derajat hidrolisis produk sebesar 75,43%±0,13, kadar air 14,64±0,19%, protein 30,06±0,002%, lemak 9,62±0,74%, dan abu 7,46±0,83%. Asam amino yang dominan adalah histidin 6,47±0,02, leusin 1,08±0,00, lisin 1,07±0,00, asam glutamat 2,60±0,01, glisin 2,39±0,01, alanin 1,44±0,00, arginin 1,34±0,00, dan asam aspartat 1,18±0,00. Nilai aktivitas antioksidan untuk RSA sebesar 32,34±0,43% dan FRAP sebesar 1,94±0,21 µMol TE/g protein. Hidrolisat yang dihasilkan mempunyai kadar protein 30,06%, histidin 6,47%, asam glutamat 2,60%, glisina 2,39%. Hidrolisat yang dihasilkan dapat dijadikan sebagai bahan tambahan pangan dengan nilai histidina yang dominan. Potensi antioksidan yang dihasilkan tergolong rendah, sehingga perlu dilakukan penelitian lanjutan secara mendalam tentang pengayaan formulasi untuk mencapai kebutuhan gizi yang lengkap serta fungsi biologis lainnya.

Kata kunci: Antioksidan; Asam amino; Hidrolisat Protein Ikan; Limbah Ikan Cakalang; Proksimat

ABSTRACT

Skipjack by-products such as frames and trim contain bioactive compounds making them suitable for processing into functional food products, one of which is fish protein hydrolysate (FPH). This study aims to describe the nutritional content and antioxidant activity of HPI. The methods of HPI production was used papain enzyme (5%) at pH 6.4, hydrolysis temperature of 61°C, and hydrolysis duration of 228 minutes. The determining of degree of hydrolysis using TCA soluble nitrogen, moisture and ash content by gravimetry, protein content by Kjeldahl, fat content by Soxhlet extraction. Amino acid profile analysis using HPLC, and antioxidant activity analysis using radical scavenging activity (RSA) and ferric reducing antioxidant power (FRAP). The degree of hydrolysis value product was 75.43%±0.13, moisture content was 14.64±0.19%, protein was 30.06±0.002%, fat was 9.62±0.74%, and ash content was 7.46±0.83%. The dominant amino acids were histidine 6.47±0.02, leucine 1.08±0.00, lysine 1.07±0.00, glutamic acid 2.60±0.01, glycine 2.39±0.01, alanine 1.44±0.00, arginine 1.34±0.00, and aspartic acid 1.18±0.00. The antioxidant activity value for RSA was 32.34±0.43% and FRAP was 1.94±0.21 µMol TE/g protein. The hydrolysate produced has protein content of 30.06%, histidine 6.47%, glutamic acid 2.60%, glycine 2.39%. The resulting hydrolysate can be used as a food additive with a dominant histidine value. The antioxidant potential of the resulting peptide is low, so further in-depth research on formulation enrichment is needed to meet complete nutritional requirements and support other biological functions.

Keywords: Antioxidant; Amino Acids; Fish Protein Hydrolysate; Skipjack Tuna By-Products, Proximate

PENDAHULUAN

Ikan cakalang (*Katsuwonus pelamis*) merupakan salah satu ikan komoditas ekonomis penting dan banyak dikonsumsi di Indonesia (Yusuf *et al.*, 2018). Data perikanan tangkap ikan cakalang di Indonesia sebesar 472.632 ton pada tahun 2023 (Kementerian Kelautan dan Perikanan [KKP], 2024), dari data tersebut menghasilkan limbah (*by-products*) sekitar 60% yang dapat menimbulkan permasalahan lingkungan apabila tidak ditangani dengan tepat (Korkmaz & Tokur, 2022). Usaha pengolahan ikan cakalang baik skala besar maupun kecil menghasilkan limbah padat (tulang, kepala, isi perut, dan lain-lainnya) maupun cair yang belum dimanfaatkan secara maksimal sehingga berpotensi mencemari lingkungan. Salah satu sentra pengolahan ikan cakalang berlokasi di Adisara, Kecamatan Jatilawang Kabupaten Banyumas Provinsi Jawa Tengah. Pada sentra tersebut ikan cakalang diolah menjadi ikan pindang dan asap, jumlah produksi ikan cakalang yang digunakan selama 1 bulan adalah 12.360 kg dengan total limbah padat yang dapat dihasilkan sebesar ± 4.944 kg (Fitriadi, *et al.*, 2023). Limbah padat tersebut dapat berupa kepala dan insang (9-12%), sirip dan kulit (1-3%), tulang (9-15%), kerangka dan hasil *trimming* (5%) serta isi perut (12-18%) (Martinez-Alvarez, *et al.* 2015; Villamil, *et al.* 2017).

Pemanfaatan limbah ikan telah mendapat perhatian serius oleh beberapa peneliti, seperti pemanfaatan telur ikan mas (Chalamaiah *et al.*, 2015), protein otot ikan sarden dan mackerel (Morales-Medina *et al.*, 2016), kulit ikan kerapu (*Epinephelus malabaricus*) (Hema *et al.*, 2017), protein otot ikan mackerel (*Scomber japonicus*) (Bashir *et al.*, 2017), isi perut ikan (Villamil *et al.*, 2017); limbah fillet (Alvares *et al.*, 2018), kepala ikan kakatua (*Chlorurus sordidus*) (Prihanto *et al.*, 2019), kepala ikan tuna sirip kuning (Vazquez *et al.*, 2022), kepala ikan sardin (Dinel *et al.*, 2021), lemi rajungan (Riyadi *et al.*, 2022). Limbah tersebut diketahui mengandung senyawa bioaktif yaitu antidiabet tipe-2, anti-Alzheimer, antioksidan, antiinflamasi, antihipertensi, dan imunomodulator yang dapat digunakan sebagai bahan nutrasetikal, pangan fungsional maupun bahan alami industri farmasi (Ramakrishnan *et al.*, 2023). Oleh karena itu, perlu dilakukan pemanfaatan limbah ikan cakalang sebagai upaya untuk mengurangi masalah pencemaran lingkungan dan meningkatkan nilai tambah yang berkelanjutan dan efisien secara ekonomi (Gilman *et al.*, 2017; Özyurt & Özkütük, 2019).

Pemanfaatan limbah ikan cakalang salah satunya menjadi hidrolisat protein ikan (HPI) sebagai bahan pangan fungsional (Nikoo *et al.*, 2023). Proses produksi HPI dapat menggunakan beberapa metode, salah satu metode yang dianggap aman dan tidak banyak mengubah nutrisi terutama komponen protein, serta sifat fungsionalnya masih terjaga adalah hidrolisis secara enzimatis (Gokoglu, 2023). Hidrolisis enzimatis memecah protein menjadi peptida-peptida yang lebih kecil, meningkatkan daya cerna protein, kelarutan dan ketersediaan asam amino esensial sehingga dapat meningkatkan nilai gizi (Yathisha *et al.*, 2022). Kandungan nutrisi hidrolisat protein ikan bervariasi tergantung dari jenis bahan baku, kondisi selama proses hidrolisis yaitu pH, suhu, lama waktu hidrolisis, jenis enzim yang digunakan, dan rasio enzim terhadap substrat (Korkmaz & Tokur, 2022). Penelitian Riyadi *et al.* (2022) menunjukkan bahwa hidrolisat lemi

(*Portunus pelagicus*) mempunyai kandungan histidin 2,08%; leusin 2,08%; lisin 2,87%; asam glutamat 0,22%; glisin 1,21%; dan alanin 1,69%. Serta penelitian Grasso *et al.*, (2024), hidrolisat dari campuran limbah tuna mengandung glisin yang tinggi (11-12%), Asam glutamat (10-11%), Histidin (9-10%), Prolin dan alanin ($\pm 8\%$), Lisin dan asam aspartat (keduanya 6-7%), Arginin ($\pm 6\%$), serta Leusin dan Hidroksi Prolin (keduanya $\pm 5\%$).

Hidrolisat protein ikan dapat meningkatkan nilai gizi produk dan berpotensi sebagai antioksidan alami dalam nutrisi manusia (Desai *et al.*, 2022). Hidrolisat protein dari timun laut (Saiwong *et al.*, 2023) yang diproduksi secara enzimatis menunjukkan aktivitas antioksidan yang mampu melawan radikal bebas dan ion logam pro-oksidatif, sehingga berpotensi sebagai antioksidan alternatif dari sumber alami untuk industri makanan. Penelitian Taheri & Anahita (2019), nilai *radical scavenging activity* (RSA) FPH II ikan tongkol yang dihidrolisis menggunakan pepsin cakalang dengan kadar 0,1; 0,3; 0,7 dan 1,2 mg/mL mempunyai nilai berkisar antara 30%-80%. Aktivitas antioksidan yang dihasilkan sangat bervariasi tergantung dari jenis sumber bahan baku yang dihidrolisis, enzim yang digunakan dan kondisi selama proses seperti pada penelitian Wang *et al.*, (2022) dan Grasso *et al.*, (2024). Penggunaan enzim protease dapat meningkatkan nilai derajat hidrolisis (DH), dan memberikan efek linier dengan sifat antioksidan yang dihasilkan (Mohanty *et al.*, 2021). Optimasi kondisi hidrolisis yaitu pH (Batish *et al.*, 2020), suhu dan lama waktu hidrolisis (Korkmaz & Tokur, 2022) serta enzim (Agustin *et al.*, 2023) yang digunakan sangat penting untuk memaksimalkan manfaat dari hidrolisat protein yang dihasilkan dengan karakteristik, fungsional dan bioaktif peptida yang mempunyai fungsi spesifik.

Hidrolisat protein limbah ikan cakalang pada penelitian ini menggunakan enzim papain (5%) dengan kombinasi perlakuan (pH=6,4; suhu hidrolisis=61°C; dan lama hidrolisis=228 menit). Penentuan perlakuan tersebut didasarkan penelitian Prasetyo *et al.*, (2024) yang menggunakan pendekatan *Response Surface Methodology* (RSM) untuk memperoleh sifat fungsional (kelarutan protein dan viskositas) HPI yang paling optimal. Hasil permodelan RSM didapatkan sebesar 51,538% untuk kelarutan proteinnya dan 3,587 (cP) untuk viskositasnya. Kelarutan protein dan viskositas merupakan parameter sifat fungsional yang berhubungan dengan karakteristik sensoris dan sistem koloid makanan (Benjakul *et al.*, 2014). Penelitian ini merupakan lanjutan dari penelitian Prasetyo *et al.*, (2024) untuk mendapatkan informasi dari aspek kandungan gizi dan potensi antioksidan yang dihasilkan, sehingga nantinya dapat dijadikan dasar untuk pengembangan HPI sebagai bahan tambahan pangan fungsional.

Perbedaan jenis bahan baku dan kondisi hidrolisat yang berbeda mempengaruhi kandungan gizi dan aktivitas antioksidan yang dihasilkan. Penelitian Klomklao & Benjakul (2016) (jeroan ikan cakalang), Yang *et al.* (2019) (gelatin tulang ikan cakalang), Jeerakul *et al.* (2022) (hati ikan cakalang) dan Vazquez *et al.* (2022) (kepala ikan tuna) didapatkan hasil karakteristik nutrisi yang bervariasi. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendeskripsikan kandungan gizi (proksimat dan profil asam amino) HPI dan potensinya sebagai antioksidan.

METODE PENELITIAN

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium IPA Terpadu Universitas Nahdlatul Ulama Purwokerto pada bulan Januari – Juli 2024. Pembuatan serbuk HPI dilakukan di Laboratorium Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Gadjah Mada pada bulan Juli 2024. Analisa derajat hidrolisis, proksimat dan aktivitas antioksidan dilakukan di Laboratorium Chemmix Pratama Bantul – DIY. Sedangkan untuk analisa profil asam amino dilakukan di Laboratorium Saraswanti Bogor.

Bahan

Bahan utama penelitian ini berupa limbah fillet cakalang (tulang dari belakang kepala hingga ke pangkal ekor dan masih ada sisa daging) dan hasil *trimming* (potongan daging ikan yang tidak digunakan atau tidak sesuai spesifikasi fillet daging ikan) (Gambar 1.). Diperoleh dari Unit Pengolahan Ikan Adisara, Jatilawang Kabupaten Banyumas Provinsi Jawa Tengah.



Figure 1. Fillet by-Product And Trimmed

Gambar 1. Limbah Fillet dan Hasil *Trimming* Ikan Cakalang

Pembuatan Hidrolisat Protein Limbah Ikan Cakalang

Pembuatan HPI berdasarkan penelitian Prasetyo *et al.*, (2024) dan telah dilakukan sedikit modifikasi pada metode pengeringan sampel dengan menggunakan *spray drying*. Pengeringan dilakukan dengan *spray drying* untuk mendapatkan bentuk serbuk (*powder*) sehingga karakteristiknya lebih stabil. Penentuan perlakuan terbaik penelitian Prasetyo *et al.*, (2024), didasarkan pada hasil analisis *Response Surface Methodology* (RSM) menggunakan *Design-Expert* (DX) 13® *Software* (Stat-Ease Inc., Minneapolis) dari beberapa variabel yaitu pH (A1=6, A2=7), suhu hidrolisis (B1=50°C, B2=60°C, B3=70°C) dan lama hidrolisis (C1=90 menit, C2=180 menit, dan C3=270 menit). Hasil perlakuan terbaik berdasarkan *software* sebesar pH 6,4, suhu hidrolisis 61°C, dan lama hidrolisis 228 menit.

Limbah ditimbang ± 100 g (limbah tulang 90%, hasil *trimming* 10%), ditambahkan akuades, dengan perbandingan bahan dan akuades (1:3) lalu dihomogenkan, dan ditambahkan enzim papain (unit aktivitas $0,0835 \pm 0,0009$ U/mL) sebesar 5% dari berat sampel. Pengukuran pH hingga 6,4 dengan menambahkan NaOH 0,1M (Merck-Supelco) dan diaduk hingga homogen. Sampel yang sudah siap kemudian dipanaskan dengan *waterbath* (thermostatic RRC 4 lubang) pada suhu 61°C selama 228 menit, setelah itu enzim

diinaktivasi pada suhu 80°C selama 30 menit. Cairan HPI yang terbentuk disaring menggunakan kertas Whatman 42, hasil larutan ekstrak HPI yang didapatkan (250mL) dikeringkan menggunakan *spray dryer* (BÜCHI Mini Spray Dryer B-290) dengan suhu inlet 140°C dan suhu outlet 95°C. Sebanyak 5 g sampel kering dari 250 mL HPI tersebut, dimasukkan ke dalam kemasan plastik klip ziplock (LDPE) dan diberi silika gel (*food grade*) kemudian disimpan kedalam *freezer* (-18°C) sebelum siap dianalisis di laboratorium.

Pengukuran Derajat Hidrolisis

Sampel 20 mg ditambahkan 20 mL asam trichloroasetat (TCA) 10%, dihomogenkan menggunakan *centrifuge* (Gemmy PLC 03) 4.500 rpm selama 15 menit pada suhu di bawah 4°C. Supernatan yang terbentuk dianalisis total nitrogen menggunakan metode *Kjeldahl* (Hoyle & Merrit, 1994). Derajat hidrolisis (DH) dihitung menggunakan Persamaan 1.

$$DH\% = \frac{(\text{nitrogen yang larut dalam TCA} 10\%)}{(\text{total nitrogen sampel})} \times 100\% \quad (1)$$

Analisis Proksimat

Analisis proksimat berdasarkan standar AOAC, kadar air (AOAC 950.46B, 2005) dan abu (AOAC 996.06, 2005) sesuai prinsip gravimetrik. Protein kasar berdasarkan metode *Kjeldahl* (AOAC 996.06, 2005), dan kadar lemak menggunakan metode *Soxhlet* (AOAC 996.06, 2005). Pengujian proksimat dilakukan secara duplo.

Analisis Profil Asam Amino

Penentuan profil 18 asam amino (9 asam amino esensial dan 9 asam amino non esensial) menggunakan manual prosedur alat HPLC (UFLC Shimadzu CBM-20A, Shimadzu Corporation, Japan), yaitu 0,2 g sampel dicampur dengan 5 mL HCl 6 N (Merck) pada suhu 110°C. Larutan sampel 20 μ L disuntikkan ke dalam alat analisis yang dilengkapi dengan kolom penukar ion dan derivatisasi pasca-kolom dengan ninhydrin. Absorbansi dibaca pada panjang gelombang 570 nm. Kuantifikasi dilakukan menggunakan standar asam amino.

Analisis Nilai Kimia dan Nilai Asam Amino

Nilai kimia dan nilai asam amino dihitung dengan cara membandingkan komposisi asam amino dari sampel dengan referensi asam amino (protein telur utuh), masing-masing rasio dikalikan 100 (WHO/FAO/UNU, 2007).

Analisis Antioksidan

Analisis antioksidan menggunakan dua metode, yaitu metode DPPH *Radical Scavenging Activity* (RSA) dan *Ferric Reducing Antioxidant Power* (FRAP) (Li *et al.*, 2013). DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazul, Sigma-Aldrich) dengan konsentrasi 100 ppm digunakan pada analisis ini, larutan sampel dibuat dengan konsentrasi 10, 50, 100, 150, 200 ppm, dan larutan stok standar 100 ppm (1 mg *quercetin* dilarutkan dalam metanol hingga volume 10 mL). Seri konsentrasi larutan yang dibuat adalah 5, 10, 15, 20, dan 25 ppm. Pengukuran RSA blanko dilakukan dengan mengambil 4 mL larutan DPPH, dihomogenkan dan kemudian disimpan di tempat gelap pada suhu 37°C. RSA sampel pada setiap konsentrasi diukur dengan cara mengambil 0,5 mL dan menambahkan 3,5 mL DPPH.

Larutan divortek dan disimpan dalam ruangan gelap pada suhu 37°C. Absorbansi blangko dan sampel diukur menggunakan spektrofotometer (Go Direct SpectroVis Plus Vernier) dengan panjang gelombang 517 nm, perhitungan RSA (%) menggunakan Persamaan 2.

$$\%Radical\ scavenging\ activity = \frac{serapan\ blanko-serapan\ sampel}{serapan\ blanko} \times 100\% \dots\dots\dots (2)$$

Penentuan aktivitas antioksidan FRAP mengacu pada Li *et al.* (2013) dan telah dilakukan modifikasi. Prosedur penentuan kadar antioksidan FRAP secara garis besar adalah mengambil 1 mL larutan sampel yang telah dihomogenkan dengan akuades ke dalam tabung reaksi. Reagen FRAP ditambahkan 3 mL kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Larutan uji dibaca serapannya pada panjang gelombang (λ = 586-595 nm). Nilai serapan paling tinggi dari suatu reaksi menunjukkan makin tinggi kemampuan untuk mereduksi Fe³⁺. Nilai absorbansi dihitung berdasarkan Persamaan 3.

$$y = bx + a \dots\dots\dots (3)$$

Keterangan: y = absorbansi; x= konsentrasi larutan Trolox

Analisis Data

Penelitian ini menggunakan metode deskriptif kuantitatif (Sugiyono, 2019), dengan tujuan untuk menggambarkan, menganalisis dan menjelaskan informasi berupa data hasil analisis laboratorium yang diperoleh. Hasil analisis laboratorium dihitung rata-rata dan standar deviasinya, kemudian dibahas dengan membandingkan penelitian lainnya serta didukung studi literatur untuk mendapatkan kesimpulan. Kesimpulan berupa data kandungan gizi dan aktivitas antioksidan sebagai pedoman untuk penelitian selanjutnya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Nilai DH HPI pada penelitian ini sebesar 75,43%. Meskipun menggunakan jensi enzim yang sama (papain), nilai DH yang dihasilkan dapat berbeda-beda. Perbedaan ini terlihat pada penelitian Chi *et.al.* (2015), dimana penggunaan enzim papain menghasilkan DH sebesar 21,23%. Nilai DH yang dihasilkan dapat berbeda karena perbedaan bahan atau bagian

ikan yang dihidrolisis, suhu dan lama waktu hidrolisis yang digunakan (Chi *et.al.* (2015). Enzim papain efektif bekerja pada kondisi (pH:6,5-7,0; suhu:40-70°C) (Aluko, 2018). Nilai DH sejalan dengan penelitian Liu *et al.*, (2015), yaitu nilainya di atas 70%, hal ini dikarenakan jenis enzim yang digunakan (papain) bekerja pada kondisi pH dan suhu yang hampir sama.

Nilai optimum DH pada penelitian Garofalo *et al.*, (2023) adalah 22%, sedangkan penelitian Korkmaz & Tokur (2022), nilai DH dari limbah ikan *trout* meningkat menjadi 65,08% dan mencapai optimum pada suhu 60°C selama 1 jam dengan konsentrasi enzim 1%. Hasil yang berbeda ditemukan pada penelitian Zhang *et al.*, (2019), nilai DH hidrolisat protein dari kepala ikan cakalang sebesar 25,76±1,68%. Meskipun bahan baku dan jenis enzim yang digunakan sama, namun DH yang optimal dapat berbeda-beda. Nilai DH yang optimal dapat disesuaikan dengan kebutuhan penggunaan dan aplikasi industri yang membutuhkan tingkat hidrolisis tertentu. DH merupakan indikator penting dalam proses hidrolisis protein, nilai DH pada hidrolisis secara enzimatis dipengaruhi oleh beberapa kondisi antara lain pH selama proses hidrolisis, suhu dan waktu hidrolisis. Faktor-faktor tersebut saling berikatan secara simultan, hal ini ditunjukkan dari kerja enzim protease yang digunakan secara spesifik pada kondisi pH dan suhu tertentu.

Proksimat

Nilai proksimat pada bahan segar yang berupa limbah fillet (18 g) dan *trimming* daging ikan cakalang (2 g) penelitian ini tersaji pada Tabel 1. Nilai proksimat HPI dapat dilihat pada Tabel 2. Kadar air, protein dan abu pada sampel masih lebih rendah dibandingkan dengan referensi yang digunakan. Sedangkan untuk nilai lemak lebih tinggi dari parameter lainnya. Hal ini dikarenakan bahan baku yang digunakan berupa limbah fillet dan hasil *trimming* dengan proporsi antara daging merah ikan cakalang yang dihidrolisis lebih banyak apabila dibandingkan dengan daging putih. Penelitian Liu *et al.*, (2014) menyatakan bahwa kandungan lemak pada daging merah ikan cakalang lebih besar bila dibandingkan pada daging putihnya. Nilai proksimat hidrolisat protein dengan bahan baku yang berbeda dan enzim papain (1-6%) pada penelitian Laishram *et al.*, (2023), menunjukkan bahwa hidrolisat limbah ikan dan *shellfish* yang dihasilkan mempunyai kadar protein antara 19,1-73,14%, kadar air antara 6,91-10,46%, kadar lemak 0,02-0,09%, kadar abu 0,6-2,4%.

Table 1. Proximate of Some Parts Of Fresh Skipjack
Tabel 1. Nilai Proksimat Beberapa Bagian Ikan Cakalang Segar

Komponen	Limbah fillet dan hasil <i>trimming</i> (%)	Segar ^a (%)	Daging Putih ^b (%)	Daging Merah ^b (%)	Kepala ^c
Air	68.10±0.01	71.76±0.42	73.62±0.21	74.94±0.20	75.6±0.5
Protein	23.73±0.40	25.29±0.00	23.85±1,11	21.63±1.58	18±3.00
Lemak	3.42±0.196	0.60±0.00	0.53±0.18	1.52±0.65	4.8±0.5
Abu	1.46±0.51	1.49±0.14	1.45±0.18	1.46±0.13	3.88±0.08

Keterangan: nilai merupakan rata-rata±standar deviasi. ^aNurjanah *et al.*, (2015); ^bLiu *et al.*, (2014); ^cLi *et al.*, (2019).
Note: Average value±deviation standar. ^aNurjanah *et al.*, (2015); ^bLiu *et al.*, (2014); ^cLi *et al.*, (2019).

Perubahan kadar protein menjadi lebih tinggi dari bahan segarnya menunjukkan bahwa proses hidrolisis berjalan efektif dalam meningkatkan nilai gizinya. Kenaikan kadar protein pada HPI disebabkan karena proses hidrolisis merombak makro molekul protein menjadi komponen sederhana yaitu peptida dan asam amino. Dimana kadar nitrogen (N) sebagai komponen penyusun peptida dan asam amino mudah larut dengan pelarut asam dan basa kuat selama pengujian. Selain itu, meningkatnya kadar protein HPI kering disebabkan oleh pengurangan jumlah air, sehingga konsentrasi nutrisi, termasuk protein dalam massa produk akhir yang lebih padat. Singkatnya, protein tidak bertambah secara absolut, akan tetapi konsentrasinya meningkat secara relatif dalam produk kering yang dihasilkan karena hilangnya pelarut (air) (Ye *et al.*, 2024).

Table 2. Proximate of Hydrolysate of Skipjack Tuna by Product (HPI) Based on Wet Basis

Tabel 2. Proksimat Hidrolisat Protein Limbah Ikan Cakalang (HPI) Berdasarkan Berat Basah

Komponen	HPI (%)	Gelatin tulang kepala ^a (%)	Hati (TLP2.5) ^b (%)
Air	14.64±0.19	6.09±0.11	8.19±0.86
Protein	30.06±0.00	83.70±0.04	68.09±1.74
Lemak	9.62±0.74	6.58±0.04	0.58±0.18
Abu	7.46±0.83	1.13±0.01	2.30±0.18

Keterangan: Nilai merupakan rata-rata±standar deviasi. ^aJalili *et al.*, (2022); ^bJeerakul *et al.*, (2022).

Note: Average value±deviation standart. ^aJalili *et al.*, (2022); ^bJeerakul *et al.*, (2022).

Tingginya kadar air pada sampel dikarenakan hidrolisat yang dihasilkan bersifat higroskopis, atau mempunyai daya ikat air yang tinggi sehingga kadar air cenderung lebih tinggi. Hal ini dikarenakan jumlah kandungan jumlah asam amino yang bersifat hidrofilik lebih besar jika dibandingkan dengan asam amino yang bersifat hidrofobik (Tabel 3.). Masih tingginya kadar air pada HPI hasil *spray dryer* juga diperkuat dari penelitian Idowu *et al.*, (2018) dan Laishram *et al.* (2023), bahwa hidrolisat yang dihasilkan bersifat higroskopis. Nilai abu yang dihasilkan pada penelitian ini tergolong tinggi, hal serupa juga ditemukan pada penelitian Klomkua & Benjakul (2016), yaitu 12,01%. Tingginya kadar abu dimungkinkan penggunaan buffer berupa NaOH pada saat reaksi hidrolisis, penelitian Jeerakul *et al.*, (2022) juga melaporkan bahwa tingginya kadar abu disebabkan oleh NaOH dan NaCl yang ditambahkan untuk mengatur pH menjadi basa maupun asam pada saat proses hidrolisis, sehingga menyebabkan terbentuknya NaCl yang lebih tinggi. Secara keseluruhan, proses hidrolisis secara enzimatis dapat berkontribusi dalam pemanfaatan limbah ikan cakalang secara berkelanjutan dan menyediakan sumber nutrisi yang potensial untuk berbagai aplikasi, sejalan dengan trend yang lebih luas dalam bidang nutrasetik (Joy *et al.*, 2023; Laishram *et al.*, 2023).

Profil Asam Amino

Total asam amino tersaji pada Table 3. Total asam amino esensial yaitu 10,81% dan 11,26% untuk asam amino non esensial. Hasil tersebut masih lebih rendah jika

dibandingkan dengan penelitian Jalili *et al.*, (2022), akan tetapi masih lebih baik jika dibandingkan dengan penelitian Liu *et al.*, (2015) dan Chi *et al.*, (2015). Hasil penelitian diperoleh 8 jenis asam amino esensial (histidin, isoleusin, leusin, lisin, fenilalanin, treonin, triptofan, dan valin), dan 8 jenis asam amino non esensial (alanin, arginin, asam aspartat, asam glutamat, glisin, prolin, serin, dan tirosin). Asam amino esensial didominasi oleh histidin 6,47%; leusin 1,08%; dan lisin 1,07%. Sedangkan asam amino non esensial didominasi oleh asam glutamat 2,60%; glisin 2,39%; alanin 1,44%; dan arginin 1,34%.

Sumandiarsa *et al.*, (2020) menyatakan bahwa asam amino esensial yang terdapat pada ikan cakalang segar adalah histidin 1,87%, lisin 1,73%, leusin 1,72%, valin 1,31%, isoleusin 1,14%, treonin 0,97%, fenilalanin 0,88% dan metionin 0,64%. Sementara dari jenis asam amino non esensial adalah asam glutamat 3,16%; asam aspartat 2,05%; alanin 1,25%; arginin 1,27%; glisin 1,11%; tirosin 0,67%; dan serin 0,51%. Asam amino esensial histidin banyak ditemukan pada ikan cakalang, karena ikan cakalang merupakan salah satu keluarga ikan *scromboidae* yang mempunyai nilai histidin bebas tinggi. Tingginya nilai histidin dari jenis spesies tuna juga dinyatakan pada penelitian Grasso *et al.*, (2024), dimana hidrolisat dari campuran limbah tuna mengandung hisitidin (9-10%) sedangkan yang lainnya seperti glisin (11-12%), asam glutamat (10-11%), prolin dan alanin (keduanya ±8%), lisin dan asam aspartat (keduanya 6-7%), arginin (±6%), serta leusin dan hidroksi prolin (keduanya ±5%).

Selain kandungan asam amino histidin, asam amino lainnya seperti asam glutamat, asam aspartat dan alanina juga dominan pada ikan cakalang, dan berkontribusi dalam memberikan rasa umami dan manis pada ikan cakalang. Hal ini juga diperkuat dari penelitian Han *et al.*, (2019), bahwa asam glutamat dan alanin berperan menghasilkan rasa umami dan manis pada ikan cakalang. Meskipun hasil penelitian ini menunjukkan bahwa profil asam amino baik esensial maupun non esensial masih dibawah hasil penelitian gelatin kepala cakalang (Jalili *et al.*, 2022), akan tetapi untuk jumlah asam amino aromatik masih lebih tinggi jika dibandingkan dengan penelitian pembanding lainnya. Jenis asam amino aromatik berperan penting terhadap aktivitas antioksidan yang diberikan (Cerretani & Bendini, *et al.*, 2010).

Mutu protein tergantung dari kelengkapan asam amino esensialnya, protein ikan mempunyai nilai biologi yang tinggi sebagai sumber asam amino esensial (Nurjanah *et al.*, 2015). Fungsi utama asam amino adalah untuk sintesis protein, produksi energi dan fungsi khusus dari masing-masing jenis asam amino. Histidin berfungsi sebagai prekursor histamin dalam rangka pertumbuhan, lisin berperan sebagai *cross-linking* proses biosintesis protein. Isoleusin berperan dalam pembentukan otot dan hemoglobin. Menurut Tessema *et al.*, (2018), asam amino mempunyai peran biologis dalam sintesis lipid dan protein, pertumbuhan tulang, dan proses lain yang penting untuk pertumbuhan linier, sehingga ketersediaan asam amino berpotensi untuk mengontrol pertumbuhan sel dan organisme.

Nilai nutrisi dan biologis suatu protein ditentukan oleh jenis, posisi dalam struktur protein, dan kandungan asam amino hidrofobik dan asam amino hidrofilik (Cha, *et al.*, 2020). Penelitian ini menunjukkan bahwa total asam amino hidrofobik sebesar 7,55% dan total asam amino hidrofilik sebesar 13,90%, hasil ini masih rendah bila dibandingkan dengan penelitian

Jalili *et al.*, (2022), dengan total asam amino hidrofobik sebesar 42,27% dan total asam amino hidrofilik sebesar 24,07% Tabel 3.) Asam amino hidrofilik mempunyai peran biologis seperti keterlibatan dalam situs aktif enzim, interaksi protein-protein, dan pengikatan ligan karena rantai sampingnya yang polar dan bermuatan.

Table 3. *Amino Acid Profile of Hydrolysate of Skipjack Tuna By Product (HPI)*
Tabel 3. Profil Asam Amino Hidrolisat Protein Limbah Ikan Cakalang (HPI)

Asam amino	HPLI cakalang (%)	Gelatin kepala cakalang ^a (%)	Hidrolisat cakalang dengan enzim alkalase ^b (%)	Hidrolisat daging merah cakalang dengan alkalase (ATH) ^c (%)	Standard WHO/ FAO/ UNU, 2007 ^d (%)	AAS ^e (%)
Asam amino essensial						
L-Histidin ^{2f}	6,47±0,02	0,43±0,00	0,50	0,00	1,6	4,04
L-Isoleucin ¹	0,43±0,00	1,10±0,06	0,02	0,00	1,3	0,33
L-Leucin ¹	1,08±0,00	2,00±0,06	0,04	0,01	1,9	0,57
L-Lisin ²	1,07±0,00	3,30±0,04	0,05	0,00	1,6	0,67
L-Methionin ¹	0,03±0,00	1,23±0,06	0,00	0,00	1,7	0,02
L-Fenilalanin ^{1f}	0,51±0,00	1,68±0,07	0,02	0,00	-	-
L-Threonin ²	0,59±0,00	2,06±0,03	0,02	0,00	0,9	0,66
L-Triptophan ^{1f}	0,04±0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	-	-
L-Valin ¹	0,59±0,00	1,60±0,07	0,03	0,00	1,3	0,45
Jumlah asam amino essensial	10,81±0,02	13,40±0,39	0,68	0,05		
Asam amino non essensial						
L-Alanina ¹	1,44±0,00	8,17±0,01	0,08	0,00	-	-
L-Arginina ²	1,34±0,00	5,49±0,01	0,01	0,00	-	-
L-Asam aspartat ²	1,18±0,00	3,45±0,01	0,03	0,01	-	-
L-Sisteina	0,24±0,00	0,00±0,00	0,00	0,00		
L-Asam glutamat ²	2,60±0,01	7,02±0,00	0,04	0,01	-	-
Glisina ¹	2,39±0,01	16,12±0,01	0,02	0,01	-	-
L-Prolina ¹	1,07±0,00	10,74±0,01	0,14	0,00	-	-
L-Serina ²	0,65±0,00	2,32±0,01	0,03	0,00	-	-
L-Tirosin ^{2f}	0,35±0,00	0,43±0,00	0,02	0,00	-	-
Jumlah asam amino non essensial	11,26±0,02	53,31±0,06	0,37	0,06		
Jumlah total asam amino	22,07±0,04	66,71±0,39	1,05	0,10		
Jumlah asam amino hidrofobik	7,55±0,01	42,27±0,34	0,35	0,04		
Jumlah asam amino aromatik	7,37±0,02	2,54±0,07	0,54	0,00		
Jumlah asam amino hidrolfilik	14,25±0,03	24,07±0,10	0,61	0,05		

Keterangan: Nilai merupakan rata-rata dua kali ulangan±standar deviasi (HPI cakalang). ¹Asam amino hidrofobik; ²Asam amino hidrofilik; ^aNilai merupakan rata-rata dari tiga kali ulangan±standar deviasi (Jalili *et al.*, 2022); ^bLiu, *et.al.* (2015); ^cChi, *et.al.* (2015); ^d*Suggested profile of essential amino acid requirements for adults (Standard WHO/ FAO/ UNU, 2007)*; ^eAAS (Amino acid score); ^fAsam amino aromatik (Weininger, 2019).
Note: *The values are the average of two replicated±deviation standart (Skipjack tuna HPI); ¹Hydrofobic amino acids; ²Hydrofilic amino acids; ^aThe values are the average of two replicated±deviation standart (Jalili, et.al., 2022); ^bLiu, et.al., (2015); ^cChi, et.al., (2015); ^dSuggested profile of essential amino acid requirements for adults (Standard WHO/ FAO/ UNU, 2007); ^eAAS (Amino acid score); ^fAromatic amino anids (Weininger, 2019).*

Skor asam amino digunakan untuk memprediksi kualitas protein dalam hal kapasitas potensial protein makanan untuk menyediakan pola asam amino yang diperlukan dalam makanan dan mengidentifikasi asam amino pembatas. Asam amino esensial yang tidak memenuhi persyaratan minimum untuk manusia atau memiliki jumlah terendah dalam protein makanan relatif terhadap protein referensi disebut sebagai asam amino pembatas (Lopez & Mohiuddin, 2022). Nilai skor asam amino essensial dari penelitian ini masih dibawah skor yang distandarkan kecuali untuk nilai histidina. Klomklao & Benjakul (2016) melaporkan bahwa asam amino essensial pada hidrolisat jeroan ikan cakalang tergolong tinggi. Secara garis besar kandungan asam amino essensial dari hidrolisat ikan tergolong tinggi dan sangat bermanfaat bagi nutrisi manusia misalnya pada penelitian Chasanah *et al.*, (2019) dan Nuryanto *et al.*, (2021). Akan tetapi perlu adanya data yang lebih

komprehensif tentang skor asam amino dari hidrolisat protein limbah ikan cakalang terutama jika dikoreksi dengan daya cerna yang sebenarnya. Oleh karena itu penelitian lanjutan terkait karakterisasi secara lengkap dari skor asam amino hidrolisat protein limbah ikan cakalang dan validasi kualitas nutrisinya apabila dikonsumsi oleh manusia sangat diperlukan.

Antioksidan

Penentuan aktivitas antioksidan dapat menggunakan beberapa metode diantaranya DPPH dan FRAP, kedua metode tersebut mempunyai kelebihan dan kelemahan masing-masing. Kelebihan metode DPPH di antaranya pengukuran cepat, sederhana, dan biaya terjangkau, sedangkan kelemahannya adalah pengukuran absorbansi harus hati-hati karena DPPH sangat reaktif terhadap perubahan pH, sinar, O_2 , dan jenis pelarut serta DPPH hanya dapat larut dalam pelarut organik (Al-Hmoud *et al.*, 2014). Penggunaan metode DPPH RSA sesuai untuk golongan peptida, dimana peptida bekerja dengan cara mendonorkan atom hidrogen atau elektronnya untuk menstabilkan atau menetralkan radikal bebas sehingga membentuk senyawa radikal baru yang lebih stabil (Zhu *et al.*, 2022).

Metode FRAP mempunyai kelebihan di antaranya lebih sederhana, cepat, tidak memerlukan alat khusus dan juga penyiapan pereaksinya mudah, sedangkan kekurangannya adalah reagen kurang stabil dan tidak spesifik bila senyawa lain tidak mengandung antioksidan (Nugraheni *et al.*, 2024). Prinsip metode FRAP dengan cara mengukur kemampuan antioksidan dalam sampel (peptida) untuk mereduksi ion ferri (Fe^{3+}) menjadi ion ferro (Fe^{2+}) dalam suasana asam. Peptida bioaktif, terutama yang mengandung asam amino hidrofobik dan aromatik, efektif dalam mentransfer elektron, yang merupakan mekanisme dasar metode FRAP (Cerretani and Bendini, 2010).

Nilai aktivitas antioksidan berdasarkan DPPH *radical scavenging activity* HPI sebesar $32,34 \pm 0,43\%$ (Gambar 2.), menunjukkan bahwa hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian sebelumnya. Zhang *et al.*, (2022) menyatakan bahwa nilai DPPH hidrolisat gelatin kulit ikan cakalang dengan asam yang dibuat pada rasio bahan:cair (1:50) sebesar $28,48 \pm 0,41\%$ pada 10 mg/mL. Sementara pada penelitian Wang *et al.*, (2022), nilai DPPH *scavenging activity* hidrolisat protein ikan cakalang sebesar $35,26 \pm 1,26\%$.

Aktivitas antioksidan yang dihasilkan disebabkan karena urutan asam amino tertentu dan struktur peptida yang terbentuk dapat memainkan peranan penting dalam memberikan efek antioksidan pada hidrolisat protein ikan yang dihasilkan. Hal ini diperkuat dari penelitian Krasae *et al.*, (2023), berat molekul dan komposisi asam amino pada hidrolisat protein dari jeroan tuna tidak berkorelasi secara langsung terhadap aktivitas DPPH *radical scavenging*.

Nilai FRAP digunakan untuk mengevaluasi kemampuan suatu antioksidan untuk mendonorkan elektron untuk mereduksi Fe^{3+} menjadi Fe^{2+} . Nilai antioksidan dengan metode FRAP tersaji pada (Gambar 3.), nilai FRAP yang dihasilkan lebih tinggi jika dibandingkan dengan referensi yang digunakan. Sifat reduksi yang dihasilkan tergantung pada kapasitas donor elektron dari peptida dan asam amino. Aktivitas antioksidan yang dihasilkan tidak terlepas dari asam amino yang bersifat hidrofobik seperti prolin, valin, tirosin, dan metionin yang membantu interaksi antara peptida dan radikal bebas dengan meningkatkan kelarutan peptida dalam lipid (Sila & Bougatef, 2016; Wong *et al.*, 2020). Selain asam amino hidrofobik, asam amino hidrofilik juga ada yang berperan

sebagai antioksidan seperti asam glutamat dan lisin dalam tetrapeptide *sequence* EVGK (asam glutamat-valina-glisina-lisina) dan RCLQ (arginina-sistina-leusina-glutamina) yang memberikan efek positif terhadap kemampuan pengkelat ion Fe^{2+} (Yang *et al.*, 2020).

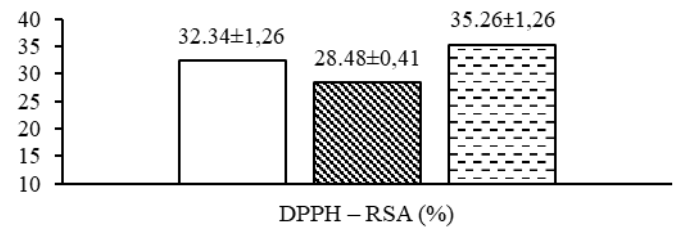


Figure 2. Antioxidant activity (DPPH - RSA); HPI (□); Gelatine from skipjack skin (Zhang *et al.*, 2022) (▨); Protein hydrolysate of skipjack tuna roe (Wang *et al.*, 2022) (▤).

Gambar 2. Aktivitas antioksidan (DPPH-RSA). Keterangan: HPI cakalang, nilai merupakan rata-rata dari dua kali ulangan ± standar deviasi (□); Hidrolisat gelatin kulit cakalang, nilai merupakan rata-rata dari tiga kali ulangan ± standar deviasi (Zhang *et al.*, 2022) (▨); Hidrolisat protein telur cakalang, nilai merupakan rata-rata dari tiga kali ulangan ± standar deviasi (Wang *et al.*, 2022) (▤).

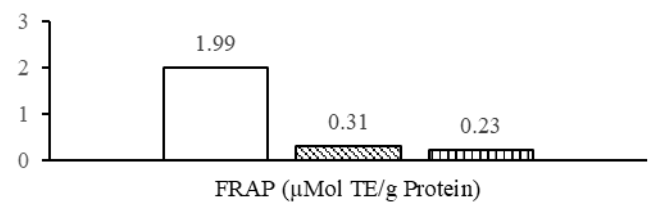


Figure 3. Antioxidant activity (FRAP); HPI (□); Tuna by products hydrolysate (Grasso *et al.*, 2024) (▨); Hydrolysate of skipjack blood with neutrase (Mongkonkamthorn *et al.*, 2020) (▤).

Gambar 3. Aktivitas antioksidan (FRAP); HPI (□); Hidrolisat limbah tuna (Grasso *et al.*, 2024) (▨); Hidrolisat darah cakalang dengan neutrase (Mongkonkamthorn *et al.*, 2020) (▤).

Korelasi peptida dengan metode aktivitas antioksidan DPPH-RSA dan FRAP adalah kemampuan peptida untuk menetralkan atau mereduksi bahan reaktif, meskipun dengan mekanisme kimia yang berbeda. Pada DPPH peptida menyumbangkan atom hidrogen ke radikal bebas DPPH sehingga radikal lebih stabil (penangkapan radikal bebas). Sedangkan pada FRAP peptida mengukur daya pereduksi, mereduksi ion Fe^{3+} menjadi Fe^{2+} sehingga dari hasil kedua metode ini dapat saling melengkapi untuk mengkonfirmasi efektivitas peptida sebagai antioksidan (Qian *et al.*, 2020). Berdasarkan dua analisis aktivitas antioksidan di atas, hidrolisat protein limbah cakalang tergolong rendah, sehingga masih diperlukan pengayaan formulasi untuk mencapai kebutuhan gizi yang lengkap. Oleh karena itu, penelitian lanjutan untuk memahami mekanisme efektivitas antioksidan yang dihasilkan karena pengaruh urutan asam amino, struktur dan karakteristik peptide untuk mengoptimalkan penggunaan hidrolisat protein limbah ikan cakalang sebagai antioksidan alami masih diperlukan.

KESIMPULAN

HPI yang dihasilkan mempunyai kadar air $14,64 \pm 0,19\%$, protein $30,06 \pm 0,002\%$, lemak $9,62 \pm 0,74\%$, dan abu $7,46 \pm 0,83\%$. Asam amino esensial yang dominan adalah histidina $6,47 \pm 0,02$, leusina $1,08 \pm 0,00$ dan lisina $1,07 \pm 0,00$, sedangkan asam amino non esensial yang dominan adalah asam glutamat $2,60 \pm 0,01$, glisina $2,39 \pm 0,01$, alanina $1,44 \pm 0,00$, dan arginina $1,34 \pm 0,00$. Potensi antioksidan dari peptida yang dihasilkan tergolong rendah, sehingga perlu dilakukan penelitian lanjutan secara mendalam tentang pengayaan formulasi untuk mencapai kebutuhan gizi yang lengkap dan fungsi biologis lainnya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Lembaga Pengelola Dana Pendidikan (LPDP) - Kementerian Keuangan dan Pusat Pelayanan Pembiayaan dan Asesmen Pendidikan Tinggi (BPI/ PPAT) - Kementerian Pendidikan Tinggi, Sains dan Teknologi Republik Indonesia atas pendanaan yang diberikan dengan nomor kontrak 0773/J5.2.3/BPI.06/10/2021.

DAFTAR PUSTAKA

- Agustin, V., Putra, M.M.P., Husni A. (2023). Impact of enzymatic hydrolysis on antioxidant activity of snakehead fish (*Channa striata*) head protein hydrolysate. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*, 15(1). 44-56. <https://doi.org/10.20473/jipk.v15i1.38391>
- Al-Hmoud, H.A., Ibrahim, N.E., El-Hallous, E.I. (2014). Surfactants solubility, concentration and the other formulations effects on the drug release rate from a controlled-release matrix. *African journal of pharmacy and pharmacology*, 8(13), 364-371. <https://doi.org/10.5897/AJPP2013>
- Aluko R.E. (2018). Food protein-derived peptides : Production, isolation, and purification. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100722-8.00016-4>
- Alvares, T.S., Conte-Junior, C.A., Pierucci, A.P., Viera de Oliveira, V., Cordeiro, E.M. (2018). Acute effect of fish protein hydrolysate supplementation on vascular function in healthy individuals. *Journal of Functional Foods*, 46, 250-255. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.04.066>
- [AOAC] Association of Official Analytical Chemist. (2005). *Official Method of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist*. Arlington : The Association of Official Analytical Chemist Inc.
- Bashir, K.M.I., Park, Y.J., An, J.H., Choi, S.J., Kim, J.H., Baek, M.K., Kim, A., Sohn, J.H., Choi, J.S., (2017). Antioxidant properties of *Scomber japonicus* hydrolysates prepared by enzymatic hydrolysis. *J. Aquat. Food. Prod. Technol.* 22(1), 107–121. <https://doi.org/10.1080/10498850.2017.1407013>
- Batish, I., Ovissipour, R., Xu, Y., Galanopoulos, M., Sismour, E., Rafeeq, S., Miyai, C., Brits, D., Valencia, P. (2020). Effects of enzymatic hydrolysis on the functional properties, antioxidant activity and protein structure of black soldier fly (*Hermetia illucens*) protein. *Insects*. <https://doi.org/10.3390/insects11120876>
- Benjakul, S., Yarnpakdee, S., Senphan, T., Halldorsdottir, S. M., Kristinsson, H. G. (2014). Fish Protein Hydrolysates: Production, Bioactivities, and Applications. In H. G. Kristinsson (Ed.), *Antioxidants and Functional Components in Aquatic Foods* (pp. 237–281). Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd
- Cerretani, L. and Bendini, A. 2010. Chapter 67 – Rapid assays to evaluate the antioxidant capacity of phenols in virgin olive oil. *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*. 625-635. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374420-3.00067-X>
- Cha, J.W., Yoon, I.S., Lee, G.W., Kang, S.I., Park, S.Y., Kim, J.S., Heu, M.S., (2020). Food functionalities and bioactivities of protein isolates recovered from skipjack tuna roe by isoelectric solubilization and precipitation. *Food Science & Nutrition*, 8(4), 1874-1887. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1470>
- Chalamaiah, M., Hemalatha, R., Jyothirmayi, T., Diwan, P.V., Bhaskarachary, K., Vajreswari, A., Kumar, R.R., Kumar, B.D. (2015). Chemical composition and immunomodulatory effects of enzymatic protein hydrolysates from common carp (*Cyprinus carpio*) egg. *Nutrition*, 31, 388-398. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2014.08.006>
- Chasanah, E., Susilowati, R., Yuwono, P., Zilda, D.S., Fawzya, Y.N. (2019). Amino acid profile of biologically processed fish protein hydrolysate (FPH) using local enzyme to combat stunting. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*, 278, 012013. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/278/1/012013>
- Chi, C.F., Hu, F.Y., Wang, B., Li, Z.R., Luo, H.Y. (2015). Influence of amino acid compositions and peptide profiles on antioxidant capacities of two protein hydrolysate from skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) dark muscle. *Marine Drugs*, 13, 2580-2601. <https://doi.org/10.3390/md13052580>
- Cotabarren, J., Mabel, R.A., Tellecheaa, M., García-Pardoc, J., Lorenzo, R.J., David, O.W., Graciela, P.M. (2019). Adding value to the chia (*Salvia hispanica* L.) expeller: Production of bioactive peptides with antioxidant properties by enzymatic hydrolysis with Papain. *Food Chemistry*, 274, 848–856. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.061>
- Desai, A.S., Brennan, M., Gangan, S.S., Brennan, C. (2022). Chapter Seven – Utilization of fish waste as a value-added ingredient: Sources and bioactive properties of fish protein hydrolysate. *Sustainable Fish Production and Processing*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-824296-4.00004-9>
- Dinel, A.L., Lucas, C., Le Faouder, J., Bouvret, E., Pallet, V., Laye, S., Joffre, C. (2021). Supplementation with low molecular weight peptides from fish protein hydrolysate reduces acute mild stress-induced corticosterone secretion and modulates stress responsive gene expression in mice. *Journal of Functional Foods*, 76, 104292. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104292>
- Fitriadi, R., Soedibya P.H.T., Palupi, M., Riviani., Sutanto., Riady, R.M., Nurhafid, M. (2023). Penerapan Teknologi

- Zero Waste Concept pada Pengolahan Ikan Tuna (Thunnus) di UKM Sari Desa Adisara, Kecamatan Jatilawang, Kabupaten Banyumas. *Artha Imperium*. Vo. 1. No. 1. 30-39. E-ISSN: 3032-2944, P-ISSN 3034-6281.
- Garofalo, S.F., Cavallini, N., Demichelis, F., Savorani, F., Mancini, G., Fino, D., Tommasi, T. (2023). From tuna viscera to added-value products: A circular approach for fish-waste recovery by green enzymatic hydrolysis. *Food and Bioproducts Processing*, 137, 155-167. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2022.11.006>
- Gilman, E., Suuronen, P., Chaloupka, M. (2017). Discards in global tuna fisheries. *Marine Ecology Progress Series*, 582, 231-252. <https://doi.org/10.3354/meps12340>
- Gokoglu, N. (2023). Chapter 6 – Value addition to seafood processing waste by using enzymes, Editor(s): Mohammed Kuddus, Pramod Ramteke. Value-Addition in Agri-food Industry Waste Through Enzyme Technology, Academic Press. 95-106. ISBN: 9780323899284. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-89928-4.00010-9>.
- Grasso, F., Martínez, M.M.A., Turrini, F., Méndez Paz, D., Vázquez Sobrado, R., Orlandi, V., Jenssen, M., Lian, K., Rombi, J., Tiso, M., et al. (2024). Antioxidant marine hydrolysates isolated from tuna mixed byproducts: An example of fishery side streams upcycling. *Antioxidants*, 13, 1011. <https://doi.org/10.3390/antiox13081011>
- Han, J.R., Tang, Y., Li, Y., Shang, W.H., Yan, J.N., Du, Y., Wu, H.T., Zhu, B.W., Xiong, Y.L. (2019). Physicochemical properties and functional characteristic of protein isolates from scallop (*Patinopecten yessoensis*) gonad. *Journal of Food Science*, 84 (5), 1023-1034. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14598>
- Hema, G.S., Joshy, C.G., Shyni, K., Chatterjee, N.S., Ninan, G., Mathew, S., (2017). Optimization of process parameters for the production of collagen peptides from fish skin (*Epinephelus malabaricus*) using response surface methodology and its characterization. *J. Food Sci. Technol.*, 54(2), 488-496. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2490-2>
- Hoyle, N.T. & Merritt, J.H. (1994). Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*). *Journal of Food Science*, 59 (1), 76 – 79.
- Idowu, A.T., Benjakul, S., Sinthusamran S., Sookchoo, P. Kishimura, H. (2018). Protein hydrolysate from salmon frames: Production, characteristic and oxidative activity. *Journal Food Biochemistry*, 2018:e12734. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12734>
- Jalili, S.H., Etemadian, Y., Alboofetileh, M., Moradi, Y. (2022). Gelatine extraction from skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) head bones by acid-hydrolysis method and its physicochemical and functional characterizations. *Aquatic Food Studies*, 2(1). <https://doi.org/10.4194/afs83>
- Jeerakul, C., Kitsanayangyong, L., Mookdasanit, J., Klaypradit, W., Tepwong, P. (2022). Functional properties and bioactivities of protein powder prepared from skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) liver using the pH shift process. *Polish Journal of Food and Nutrition Science*, 72(4), 347-359. <https://doi.org/10.31883/pjfn/155225>
- Joy, J.M., Maruth, P., Paul, P.T., Rose, K.V.S., Akshay, P., Jacob, M.R., Dara, P.K., Mathew, S., Anandan, R. (2023). Characterization and evaluation of antioxidant properties of skipjack (*Katsuwonus pelamis*) tuna skin gelatine hydrolysate. *International Journal of Zoology and Applied biosciences*, 8(4), 21-27. <https://doi.org/10.55126/ijzab.2023.v08.i04.004>
- Kementerian Kelautan dan Perikanan. (2024). Data Produksi Perikanan Tangkap. <https://portaldata.kkp.go.id/datainsight/produksi-ikan-tangkap> diakses pada 3 Mei 2025.
- Klomklao, S. & Benjakul, S. (2016). Utilization of tuna processing by-products: Protein hydrolysate from skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) viscera. *Journal of food Processing and Preservation*. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12970>
- Korkmaz, K & Tokur, B. (2022). Optimization of hydrolysis conditions for the production of protein hydrolysates from fish waste using response surface methodology. *Food Bioscience*. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101312>
- Krasae, K., Worawattanamateekul, W., Hinsui, J. (2023). Effects of peptide fractions and amino acids on antioxidant properties of autolyzed tuna viscera protein hydrolysate. *Food Research*, 7(5), 156-163. [https://doi.org/10.26656/fr.2017.7\(5\).270](https://doi.org/10.26656/fr.2017.7(5).270)
- Laishram, M., Desai, A.S., Pathan, D.I., Pawase, A.S., Wasave, S.M. (2023). Functional properties and proximate analysis of fish waste protein hydrolysate processed using enzymes. *Current Research in Nutrition and Food Science*, 11(2), 655-665. <https://doi.org/10.12944/crnfsj.11.2.16>
- Li, W., Liu, Y., Jiang, W., Yan, X. (2019). Proximate composition and nutritional profile of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) heads and skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) heads. *Molecules*, 24, 3189. <https://doi.org/10.3390/molecules24173189>
- Liu, J., Lyu, F., Zhou, X., Wang, B., Wang, B., Wang, X., Ding, Y. (2015). Preparation of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) protein hydrolysate using combined controlled enzymatic hydrolysis and glycation for improved solubility and emulsifying properties. *Journal of Food and Nutrition Research* 3(7) 471-477. <https://doi.org/10.12691/jfmr-3-7-9>
- Liu, S., Li, X., Zhou, X., Zhang, X., Ding, Y. (2014). Comparative study of basic characteristic of ordinary and dark muscle in skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). *Food Science Biotechnology*, 23(5), 1397-1404. <https://doi.org/10.1007/s10068-014-019-4>
- Lopez, M.J., & Mohiuddin, S.S., (2022). Biochemistry, Essential Amino Acids. StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing,, Treasure Island (FL). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557845/#_N_BK557845_pubdet_>
- Martínez-Alvarez, O., Chamorro, S., Brenes, A. (2015). Protein hydrolysates from animal processing by-products as a source of bioactive molecules with interest in animal feeding: A review, *Food Research International* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.04.005>
- Mohanty, U., Majumdar, R.K., Mohanty, B., Mehta, N. K., Parhi, J. (2021). Influence of the extent of enzymatic hydrolysis on the functional properties of protein hydrolysates from visceral waste of *Labeo rohita*. *Journal of Food Science and Technology*, 58(11), 4349–4358.

- Mongkonkamthorn, N., Maila, Y., Yarnpakdee, S., Makkhun, S., Regenstein, J.M., Wangtueai, S. (2020). Production of protein hydrolysate containing antioxidant and angiotensin-i-converting enzyme (ACE) inhibitory activities from tuna (*Katsuwonus pelamis*) blood. *Processes*, 8, 1518. <https://doi.org/10.3390/pr8111518>
- Morales-Medina, R., Tamm, F., Guadix, A.M., Drusch, S. (2016). Functional and antioxidant properties of hydrolysates of sardine (*S. pilchardus*) and horse mackerel (*T. mediterraneus*) for the microencapsulation of fish oil by spray-drying. *Food Chemistry*, 194, 1208-1216. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.122>
- Nikoo, M., Regenstein, J.M., Yasemi, M. (2023). Protein hydrolysates from fishery processing by-products: production, characteristics, food applications, and challenges. *Review. Foods*, 12, 4470. <https://doi.org/10.3390/foods12244470>
- Nugraheni, T.S., Setiawan, I., Putri, A.A., Sukmawati, A.W., Khasanah, L.N., Nisa, L.K., Putri, L.N.H., Wulandari, S.K., Riswana, S.A. (2024). Tinjauan artikel: Macam-macam metode pengujian aktivitas antioksidan. *Jurnal Farmasi (Journal of Pharmacy)*, 13(1), 39-50.
- Nurjanah., Suseno, S.H., Hidayat, T., Paramudhita, P.S., Ekawati, Y., Arifianto, T.B. (2015). Changes in nutritional composition of skipjack (*Katsuwonus pelamis*) due to frying process. *International Food research Journal*, 22(5), 2093-2102.
- Nuryanto, Chasanah, E., Afifah, D.N., Sulchan, M., Martosuyono, P., Ishan, K. (2021). The effect of hydrolysate on amino acid levels in nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Food Research* 5(Suppl. 3), 85-89. [https://doi.org/10.26656/fr.2017.5\(S3\).003](https://doi.org/10.26656/fr.2017.5(S3).003)
- Özyurt, G., & Özkutuk, A.S., (2019). Advances in discard and by-product processing. <https://doi.org/10.1201/9780429327551-16>
- Prasetyo, D.Y.B., Agustini T.W., Anjani G., Riyadi P.H. (2024). Functional properties of protein hydrolysates from Skipjack Tuna by-products using response surface methodology. *Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology*, 19(3), <https://doi.org/10.15578/squalen.929>
- Prihanto, A.A, Nurdiani, R., Bagus, A.D. (2019). Production and characteristics of fish protein hydrolysate from parrotfish (*Chlorurus sordidus*) head. *PeerJ*. 7:e8297. <https://doi.org/10.7717/peerj.8297>
- Qian, B., Zhao, X., Yang, Y., Tian, C. (2020). Antioxidant and anti-inflammatory peptide fraction from oyster soft tissue by enzymatic hydrolysis. *Food Science and Nutrition*. Vol.8 Issue 7. 3947-3956. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1710>
- Ramakrishnan, S.R., Jeong, C.R., Park, J.W., Cho, S.S., Kim, S.J. (2023). A review on the processing of functional proteins or peptides derived from fish by-products and their industrial applications. *Heliyon*, 9. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e14188>
- Riyadi, P.H., Susanto, E., Anggo, A.D., Rifai, M., Prasetyo, D.Y.B. (2022). Amino acids profile of hydrolysate protein from nonshelled small crab (*Portunus pelagicus*) waste. *ARNP journal of engineering and applied science*, 17(7), 751-758.
- Saiwong, S., Autsavapromporn, N., Siriwoharn, T., Techapun, C., Wangtueai, S. (2023) Enzymatic hydrolysis optimization for preparation of sea cucumber (*Holothuria scabra*) hydrolysate with an antiproliferative effect on the HepG2 liver cancer cell line and antioxidant properties. *Int. J. Mol. Sci*, 24, 9491. <https://doi.org/10.3390/ijms24119491>
- Sila, A., & Bougatef, A. (2016). Antioxidant peptides from marine by-products: Isolation, identification and application in food systems. A review. *Journal of Functional Foods*, 21, 10-26. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.11.007>
- Sugiyono, S. (2019). Metode penelitian kuantitatif kualitatif dan R&D. (pp.1-444). Alfabeta Bandung.
- Sumandiarsa, I.K., Siregar, R.R., Dewi, KAS. (2020). Pengaruh metode pemasakan terhadap nilai sensori dan profil asam amino cakalang (*Katsuwonus pelamis*) masak. *Jurnal Kelautan dan Perikanan Terapan*, 3(2), 51-57.
- Taheri, A. & Anahita, B.G. (2019). Antioxidant and ACE inhibitory activities of kawaka (*Euthynnus affinis*) protein hydrolysate produced by skipjack tuna pepsin. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. <https://doi.org/10.1080/10498850.2019.1707924>
- Tessema, M, Gunaratna, N.S, Brouwer, I.D, Donato, K., Cohen, J.L, McConnell M, et al. (2018). Associations among high-quality protein and energy intake, serum transthyretin, serum amino acids and linear growth of children in Ethiopia. *Nutrients*, 10(11), 1776.
- Vazquez, J.A., Pedreira, A., Duran, S., Cabanelas, D., Souto-Montero, P., Martinez, P., Mulet, M., Perez-Martin, R.I., Valcarcel, J. (2022). Biorefinery for tuna wastes: Production of protein hydrolysate, high-quality oils, minerals and bacterial peptones. *Journal of Cleaner Production*, 357, 131909. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.131909>
- Villamil, O., Vaquiro, H., Solanilla, J.F. (2017). Fish viscera protein hydrolysates: Production, potential applications and functional and bioactive properties. *Food Chemistry*, 224, 160-171. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.12.057>
- Wang, J., Wang, Y.M., Li, L.Y., Chi, C.F., Wang, B. (2022). Twelve antioxidants peptides from protein hydrolysate of skipjack Tuna (*Katsuwonus pelamis*) roe prepared by flavourzyme : Purification, sequence identification, and activity evaluation. *Frontiers in Nutrition*, 8, 813780. <http://dx.doi.org/10.3389/fnut.2021.813780>
- Weininger, U. (2019). Chapter Three - Optimal isotope labelling of aromatic amino acid side chains for NMR studies of protein dynamics. *Methods in Enzymology*. Vol. 614. 67-86. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2018.08.028>
- WHO/ FAO/ UNU. (2007). Protein and amino acid requirements in human nutrition. Food and Agriculture Organization of the United Nations. World Health Organization and United Nations University. Geneva. Switzerland.
- Wong, F.C., Xiao, J., Wang, S., Ee, K.Y., Chai, T.T. (2020). Advances on the antioxidant peptides from edible plants

- sources. *Trends Food Science and Technology*, 99, 44-57. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.02.012>
- Yang, X.R., Zhao, Y.Q., Qiu, Y.T., Chi, C.F., Wang, B. (2019). Preparation and characterization of gelatin and antioxidant peptides from Gelatin hydrolysate of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) bone stimulated by in vitro gastrointestinal digestion. *Marine Drgus*, 17, 78. <http://dx.doi.org/10.3390/md17020078>
- Yang, J., Huang, J., Dong, X., Zhang, Y., Zhou, X., Huang, M., Zhou, G. (2020). Purification and identification of antioxidant peptides from duck plasma proteins. *Food Chem*, 319, 126534. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126534>
- Yathisha, U.G., Vaidya, S., Sheshappa, M.B. (2022). Functional properties of protein hydrolyzate from ribbon fish (*Lepturacanthus savala*) as prepared by enzymatic hydrolysis. *International Journal of Food Properties*. <https://doi.org/10.1080/10942912.2022.2027964>
- Ye, M., Wang, Z., Yan, X., Zeng, Z., Peng, T., Xia, J., Zhao, J., Wang, W., Gong, D., & Yu, P. (2024). Effects of Drying Methods on the Physicochemical and Functional Properties of *Cinnamomum camphora* Seed Kernel Protein Isolate. *Foods*, 13(6), 968. <https://doi.org/10.3390/foods13060968>
- Yusuf, M., Legowo, A.M., Albaarri, A.N., Darmanto, Y.S., Agustini, T.W., Setyastuti A.I. (2018). Mapping performance of the fishery industries innovation : A survey in the North Coast of Java. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 102. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/102/1/012083>
- Zhang, L., Zhao, G.X., Zhao, Y.Q., Qiu, Y.T., Chi, C.F., Wang B. (2019). Identification and active evaluation of antioxidant peptides from protein hydrolysates of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) head. *Antioxidants*, 8, 318. <https://doi.org/10.3390/antiox8080318>
- Zhang, S.Y., Zhao, Y.Q., Wang, Y.M., Yang, X.R., Chi, C.F., Wang, B. (2022). Gelatins and antioxidant peptide from skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) skins: Purification, characterization, and cytoprotection on ultraviolet-A injured human skin fibroblast. *Food Bioscience*, 50, 102138. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.102138>
- Zhu, Y., Lao, F., Pan, X., Wu, J. (2022). Review: Food protein-derived antioxidant peptides: molecular mechanism, Stability and Bioavailability. *Biomolecules*. 12. 1622. <https://doi.org/10.3390/biom12111622>