

LIMBAH INDUSTRI FILET IKAN PATIN UNTUK HIDROLISAT PROTEIN

Mala Nurilmala*, Tati Nurhayati, Rieska Roskananda

Departemen Teknologi Hasil Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, IPB

Jalan. Lingkar Akademik, Kampus IPB Dramaga-Bogor 16680

Telepon. +622518622915 Faks. +622518622916.

*Korespondensi : mnurilmala@ipb.ac.id

Diterima: 10 Februari 2018/ Disetujui: 11 Juli 2018

Cara sitasi: Nurilmala M, Nurhayati T, Roskananda R. 2018. Limbah industri filet ikan patin untuk hidrolisat protein. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 21(2): 287-294.

Abstrak

Limbah industri filet ikan patin terutama kepala dan tulang memiliki potensi sebagai bahan baku pembuatan hidrolisat protein. Hidrolisat protein merupakan hasil hidrolisis protein dan diketahui memiliki manfaat bioaktif. Tujuan penelitian ini untuk membuat hidrolisat protein dari limbah industri filet ikan patin dan menentukan aktivitas pengikatan kalsiumnya. Penelitian ini terdiri dari dua tahap, tahap pertama terdiri dari pembuatan hidrolisat protein secara enzimatis menggunakan konsentrasi enzim papain yang berbeda (4%, 5% dan 6%). Hidrolisat protein tersebut dianalisis derajat hidrolisisnya dan aktivitas pengikatan kalsium dengan menggunakan AAS. Tahap kedua yaitu analisis *UV scanning* untuk melihat penyerapan maksimum hidrolisat protein dan analisis komposisi asam amino. Derajat hidrolisis yang dihasilkan dari penelitian ini berbanding lurus dengan konsentrasi enzim yang digunakan. Hidrolisat protein tersebut memiliki derajat hidrolisis 43,13% pada konsentrasi enzim 6% (v/v). Aktivitas pengikatan kalsium tertinggi oleh hidrolisat protein yaitu 122,73 mg L⁻¹. Intensitas serapan pada hidrolisat protein dengan penambahan kalsium lebih rendah apabila dibandingkan dengan intensitas absorpsi hidrolisat protein tanpa penambahan kalsium, hal ini mengindikasikan adanya aktivitas pengikatan kalsium oleh hidrolisat protein. Komposisi asam amino tertinggi pada hidrolisat protein limbah filet ikan patin yaitu asam glutamat.

Kata kunci: hidrolisat protein, kalsium, limbah filet patin, *Pangasius pangasius*, papain

Waste of Patin Filleting Industry for Protein Hydrolysate

Abstract

Patin (*Pangasius*) filleting industry by-products, particularly head and bone are potential sources for protein hydrolysate. Protein hydrolysate are hydrolysis products of proteins and are known to have various bioactive functions. Thus, the aims of this research were to produce protein hydrolysate as well as to determine its calcium binding activity. This research was conducted into two steps. The first step was to produce the protein hydrolysate using papain with the concentrations of 4%, 6% and 8% (v/v). Subsequently, degree of hydrolysis and calcium binding of the protein hydrolysate were determined. The second steps was to investigate the maximum absorption of protein hydrolysate and its amino acid analysis. The result showed that the degree of hydrolysis of the protein hydrolysate was increased with the increasing concentration of papain. The degree of hydrolysis was 43.13% by Papain 6% (v/v). Meanwhile the highest calcium-binding activity of the protein hydrolysate was 122.73 mg L⁻¹. The absorption intensity of protein hydrolysate with the addition of calcium was lower compared than that of without addition of calcium, indicating the calcium was effectively bound by protein hydrolysate. The highest content of amino acid of fish protein hydrolysate was glutamic acid.

Keywords: calcium-binding, catfish fillet by product, *Pangasius pangasius*, papain, protein hydrolysate

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara yang memiliki potensi produksi perikanan yang tinggi. Sumbangsih perikanan Indonesia tidak dapat dipisahkan dari perikanan budidaya, yang tumbuh secara signifikan dari tahun ke tahun. Produksi ikan patin dari tahun 2010 hingga tahun 2014 menunjukkan pola yang selalu meningkat yaitu sebesar 147.888 ton pada tahun 2010 menjadi 418.002 ton pada tahun 2014 (KKP 2015). Perbandingan total produksi ikan patin nasional terhadap total produksi ikan patin dunia pada tahun 2011 bahkan menempatkan Indonesia menempati urutan kedua terbesar sebagai penghasil produk patin (KKP 2013).

Proses pengolahan ikan di Indonesia menghasilkan produk filet yang kemudian dijual dalam bentuk filet segar maupun beku (Hastarini *et al.* 2012). Sathivel *et al.* (2012) menyebutkan bahwa rendemen pada proses pengolahan filet ikan patin hanya sekitar 45% sehingga menghasilkan presentase limbah yang cukup besar.

Limbah dari hasil pengolahan ikan patin telah menimbulkan permasalahan baru, oleh karena itu, pemanfaatan dan pengolahan limbah dari kegiatan filet ikan patin diperlukan agar dapat mengurangi dampak negatif dari limbah yang dihasilkan oleh industri pengolahan filet patin. Utomo *et al.* (2014) menjelaskan bahwa limbah filet ikan patin dapat diolah menjadi hidrolisat protein sehingga mempunyai nilai ekonomis.

Hidrolisat protein ikan (HPI) merupakan produk cair yang terbuat dari ikan dengan penambahan enzim proteolitik untuk mempercepat proses hidrolisis dalam kondisi yang terkendali dengan hasil akhir berupa campuran komponen protein (Piggot dan Tucker 1990). Hidrolisat protein ikan dapat digunakan sebagai suplemen makanan atau dapat dimakan langsung sebagai makanan untuk meningkatkan asupan protein (Utomo *et al.* 2014). Chalamaiah *et al.* (2012) menjelaskan bahwa hidrolisat protein ikan dari reaksi pemecahan enzimatik dapat mengkonversi protein ikan menjadi peptida yang lebih kecil yang biasanya mengandung 2-20 asam amino.

Nie *et al.* (2014) menjelaskan bahwa hidrolisat protein tersusun atas bioaktif peptida yang memiliki aktivitas pengikatan kalsium. Aktivitas pengikatan kalsium berfungsi untuk memaksimalkan penyerapan kalsium dalam tubuh. Charoenphun *et al.* (2013) menjelaskan bahwa perubahan pH akibat eksresi asam lambung akan mengakibatkan kurangnya kelarutan kalsium dalam tubuh sehingga asupan kalsium menjadi kurang optimal. Mardiyah dan Sartika (2014) menjelaskan bahwa asupan kalsium yang optimal diperlukan untuk memaksimalkan massa puncak serta mempertahankan massa tulang pada usia dewasa serta meminimalkan kehilangan massa tulang pada usia lebih lanjut. Sharma *et al.* (2011) menyebutkan bahwa asam amino mempunyai sifat yang anionik sehingga memungkinkan dalam pembentukan kompleks yang larut dengan kalsium dan mencegah pembentukan kalsium fosfat yang tidak larut.

Limbah filet ikan patin terutama kepala dan tulang dalam bentuk hidrolisat protein diduga mempunyai potensi dalam aktivitas pengikatan kalsium sehingga diharapkan menjadi alternatif baru untuk konsumen yang cenderung intoleran terhadap laktosa.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah limbah filet patin berupa kepala dan tulang dari Unit produksi Hasil Perairan, Departemen Teknologi Hasil Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor dan enzim papain (Merck, Jerman) dengan aktivitas 40 USP. Bahan lainnya yang digunakan untuk analisis derajat hidrolisis adalah *trichloroacetic acid* (Merck, Jerman). Bahan untuk analisis asam amino yaitu HCl, larutan buffer kalium borat pH 10,4; peraksi ortoftaladehida (OPA), Na-asetat, Na-EDTA, methanol, tetrahidrofur (THF), larutan brij-30, larutan standar amino 0,5 $\mu\text{mol/mL}$. Bahan untuk analisis pengikatan kalsium CaCl_2 dan NaOH. Bahan kimia yang digunakan berasal dari produsen Merck, Jerman.

Alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi alat untuk preparasi, timbangan digital (Oxone), blender, *centrifuge* (HIMAC CR 21G), *waterbath shaker* (Wise bath shaker WSB-18), *freeze dryer* (Chris Alpha 2-43360 harz), kertas saring *whatman* no 1, tanur pengabuan, *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) (Shidmadzu), *Atomic Absorption Spektrofotometer* (AAS) (Shidmadzu), desikator dan vortex.

Metode Penelitian

Pembuatan hidrolisat protein

Pembuatan hidrolisat protein menggunakan metode hidrolisis enzimatis mengacu Utomo *et al.* (2014). Limbah filet ikan patin yang berupa tulang dan kepala dihaluskan kemudian dicampur akuades dengan rasio 1:7 (Charoenphun *et al.* 2013). Campuran kemudian diblender dan dihomogenisasi. Homogenat disesuaikan pada pH 8. Homogenat dihidrolisis dengan penambahan enzim papain konsentrasi 4%, 6% dan 8% (v/v) selama 5 jam pada suhu 55°C. Selanjutnya, hidrolisat dipanaskan dengan suhu 80°C selama 20 menit dengan tujuan untuk menginaktivasi enzim. Sampel kemudian disentrifugasi selama 20 menit pada 5000 xg bertujuan memisahkan supernatan dan natan. Hidrolisat protein berupa supernatan kemudian dianalisis lebih lanjut.

Pengukuran derajat hidrolisis

Perhitungan derajat hidrolisis mengacu penelitian Amiza *et al.* (2012). Sebanyak 20 mL hidrolisat protein ditambahkan TCA 20% (b/v) sebanyak 20 mL. Campuran kemudian didiamkan selama 30 menit agar terjadi pengendapan, kemudian disentrifugasi (kecepatan 7.800 xg, selama 15 menit). Supernatan dianalisis kadar nitrogennya menggunakan metode Kjeldahl (AOAC 2005). Derajat hidrolisis dihitung menggunakan rumus berikut (Hoyle dan Merritt, 1994):

$$\text{Derajat hidrolisis} = \frac{\text{Nitrogen terlarut TCA 10\%}}{\text{Nitrogen total sampel}} \times 100\%$$

Analisis kapasitas pengikatan kalsium menggunakan AAS

Pengujian aktivitas pengikatan kalsium mengacu pada metode Mendez *et al.* (2013) dengan modifikasi. Sampel hidrolisat protein sebanyak 4 mm dicampur dengan 1 mL CaCl_2 0,006 N, selanjutnya campuran didiamkan selama 30 menit pada suhu 30°C dengan pH 7,8. Sampel disaring menggunakan kertas *Whatman* no.1.

Kandungan kalsium filtrat diuji dengan AAS. Konsentrasi enzim terbaik yang memiliki aktivitas pengikatan kalsium tertinggi dalam pembuatan HPI diuji lanjut menggunakan *UV-scanning* dan dilakukan analisis asam amino

Analisis UV-Scanning

Analisis *UV-scanning* mengacu pada metode Nie *et al.* (2014). Daerah serapan yang digunakan pada penelitian ini antara 200-400 nm. Sampel hidrolisat protein sebanyak 4 mL dicampur dengan 1 mL CaCl_2 0,006 N. Campuran didiamkan selama 30 menit pada suhu 30°C dengan pH 7,8. Sampel disaring menggunakan kertas *Whatman* no.1 kemudian dilakukan *UV-scanning* pada panjang gelombang 200-400 nm. Tujuan analisis *UV-scanning* pada penelitian ini yaitu untuk menentukan puncak serapan pada hidrolisat protein dan hidrolisat protein dengan penambahan CaCl_2 .

Analisis asam amino

Analisis asam amino dilakukan untuk mengetahui karakteristik asam amino yang terdapat pada produk. Prinsip analisis asam amino menggunakan HPLC adalah memanfaatkan reaksi pra kolom gugus amino, yaitu pereaksi ortoftalaldehid (OPA) yang akan bereaksi dengan asam amino primer. Asam amino primer dalam suasana basa, mengandung merkaptoetanol membentuk senyawa yang berfluoresensi sehingga dapat dideteksi dengan detektor fluorensensi. Analisis asam amino dilakukan menggunakan metode AOAC (2005).

HASIL DAN PEMBAHASAN Derajat Hidrolisis

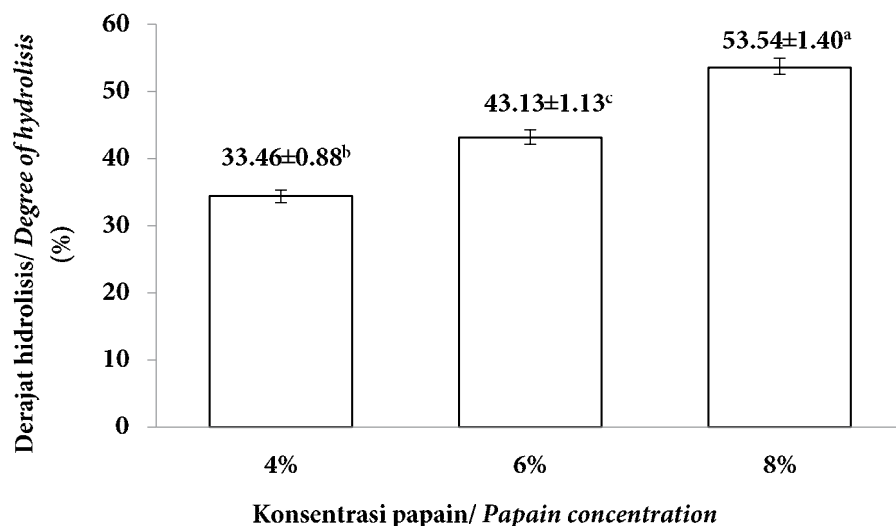
Derajat hidrolisis merupakan parameter kunci dalam memantau reaksi hidrolisis, semakin tinggi derajat hidrolisis menunjukkan semakin efektif proses hidrolisis dalam memecah ikatan peptida (Charoenphun *et al.* 2013). Nilai rata-rata derajat hidrolisis hidrolisat protein limbah filet ikan patin dengan konsentrasi enzim yang berbeda disajikan pada Gambar 1.

Data pada Gambar 1 menunjukkan perbedaan nilai derajat hidrolisis yang signifikan pada masing-masing konsentrasi enzim papain yang digunakan. Derajat hidrolisis hidrolisat protein dengan konsentrasi enzim papain 8% (v/v) lebih tinggi dibandingkan derajat hidrolisis hidrolisat protein dengan konsentrasi enzim papain 4% dan 6% (v/v). Nurhayati *et al.* (2013) menyatakan bahwa semakin besar konsentrasi enzim papain yang ditambahkan akan menyebabkan peningkatan nilai derajat hidrolisis yang dihasilkan. Haslaniza *et al.* (2010) menjelaskan bahwa semakin tinggi konsentrasi enzim yang digunakan akan menyebabkan peningkatan nitrogen terlarut dalam hidrolisat protein akibat terjadinya pemutusan ikatan peptida. Kondisi ini menyebabkan terjadinya peningkatan nilai derajat hidrolisis.

Kapasitas Pengikatan Kalsium Hidrolisat Protein

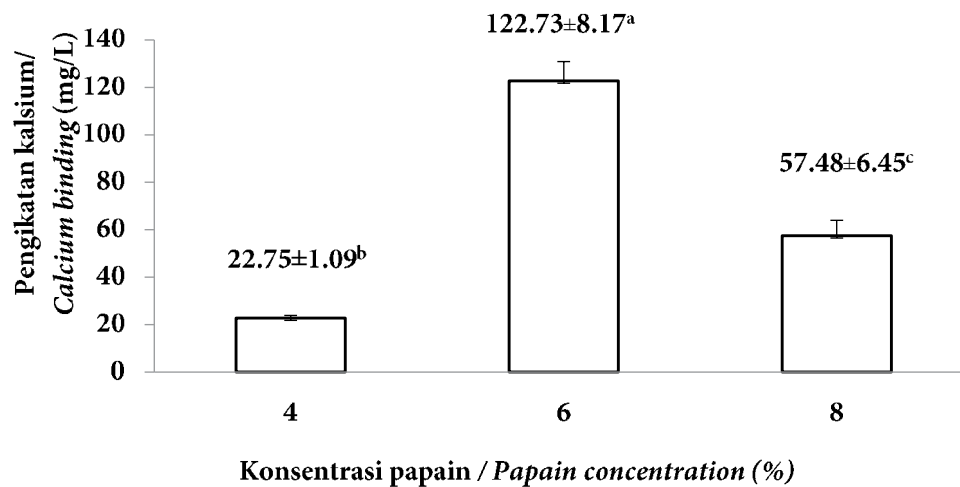
Hidrolisat protein limbah ikan patin memiliki aktivitas pengikatan kalsium yang berbeda pada setiap konsentrasi enzim papain. Nilai rata-rata aktivitas pengikatan kalsium dari masing-masing perlakuan disajikan pada Gambar 2.

Hidrolisat protein dengan konsentrasi enzim papain 4% menghasilkan aktivitas pengikatan kalsium sebesar 22,75 mg/L, lebih rendah apabila dibandingkan dengan aktivitas pengikatan kalsium untuk hidrolisat protein dengan konsentrasi enzim papain 6% yaitu 122,73 mg/L dan hidrolisat konsentrasi 8% yaitu 57,48 mg/L. Gambar 2 menunjukkan perbedaan kapasitas pengikatan kalsium yang signifikan pada masing-masing konsentrasi enzim papain yang digunakan. Kapasitas pengikatan kalsium mengalami kenaikan pada konsentrasi enzim papain 6% (v/v) akan tetapi menurun pada konsentrasi enzim papain 8% (v/v). Thuy *et al.* (2015) melaporkan bahwa sifat fungsional pada hidrolisat protein seperti aktivitas pengikatan kalsium yang maksimal tidak tercapai pada derajat hidrolisis yang paling tinggi. Hal tersebut dikarenakan semakin tinggi nilai derajat hidrolisis yang dihasilkan akan menyebabkan ukuran molekul protein yang semakin kecil. Charoenphun *et al.* (2013) menyatakan



Gambar 1 Nilai derajat hidrolisis hidrolisat protein limbah filet ikan patin dengan konsentrasi yang berbeda

Figure 1 Hydrolysis of hydrolyzate grades of patin (*Pangasius pangasius*) fillet waste protein with different concentrations



Gambar 2 Kapasitas pengikatan kalsium hidrolisat protein pada konsentrasi enzim yang berbeda
 Figure 2 Capacity of binding of calcium hydrolyzate protein with different enzyme concentrations

bahwa berat molekul pada hidrolisat protein ikan nila memainkan peranan yang cukup penting dalam aktivitas pengikatan kalsium. Hoa *et al.* (2008) menyebutkan peptida dengan panjang asam amino sekitar 7-30 umumnya mempunyai kemampuan pengikatan kalsium paling optimal.

Hasil *UV-Scanning* dari Hidrolisat Protein

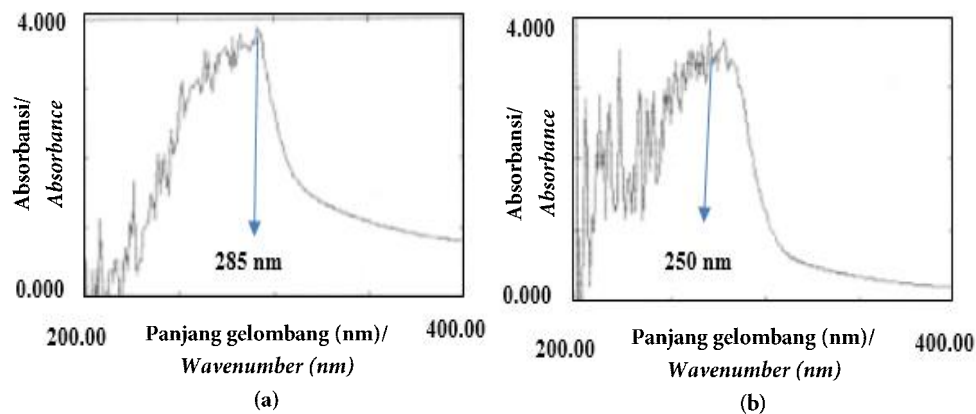
Daerah serapan yang digunakan pada penelitian ini antara 200-400 nm. Tujuan analisis *UV-scanning* pada penelitian ini yaitu untuk menentukan puncak serapan pada hidrolisat protein dan hidrolisat protein dengan penambahan CaCl_2 .

Koefisien penyerapan maksimum protein merupakan perwakilan dari stuktur khas protein (Goldfarb *et al.* 1951). Protein biasanya menunjukkan penyerapan maksimum antara 275-280 nm, hal tersebut disebabkan oleh absorbansi dari asam amino aromatik (Schmid 2001). Absorbansi maksimum pada hidrolisat protein limbah filet ikan patin (Gambar 5) terjadi antara panjang gelombang 275-285 nm. Penambahan CaCl_2 pada hidrolisat protein limbah filet ikan patin menyebabkan terjadinya penurunan puncak absorbansi (Gambar 5). Penurunan puncak serapan pada hidrolisat protein dengan penambahan

kalsium mengindikasikan adanya pengikatan kalsium oleh hidrolisat protein (Nie *et al.* 2014). Perubahan transisi absorpsi setelah dilakukan penambahan kalsium pada hidrolisat protein mencerminkan adanya penyesuaian elektron valensi akibat reaksi pengikatan kalsium oleh peptida (Jin *et al.* 2011). Nie *et al.* (2014) menyatakan bahwa penyerapan optimal pada hidrolisat protein sisik ikan terjadi antara panjang gelombang 200-280 nm yang merupakan karakteristik spektral dari peptida asam amino. Selain itu intensitas serapan kompleks kalsium peptida sisik ikan nila dengan penambahan kalsium lebih rendah bila dibandingkan dengan intensitas serapan untuk peptida saja, hal tersebut menunjukkan bahwa kalsium mengalampengikatan oleh hidrolisat protein sisik ikan nila.

Komposisi Asam Amino Hidrolisat Protein Limbah filet Ikan Patin

Hasil analisis komposisi asam amino produk hidrolisat protein limbah filet ikan patin dengan metode HPLC disajikan pada Tabel 1. Hidrolisat protein limbah filet ikan patin memiliki 15 macam asam amino (Tabel 1). Mutu protein menurut Purbasari (2008) dapat dinilai dari perbandingan asam amino yang terkandung dalam protein tersebut. Kualitas protein dapat dilihat dari kandungan



Gambar 2 (a) Puncak absorbansi pada hidrolisat protein, (b) Puncak absorbansi hidrolisat protein dan penambahan CaCl

Figure 2 (a) Absorbance peak of protein hydrolyzate, (b) Absorbance peak of protein hydrolyzate and the addition of CaCl

Tabel 1 Komposisi asam amino hidrolisat protein limbah filet ikan patin
Table 1 Composition amino acid of hydrolyzate protein from *Pangasius fillet* waste

Asam amino/ Amino acid	Hidrolisat protein kepala dan tulang ikan patin (%)/ Hydrolyzate of head protein and patin (<i>Pangasius</i>) bones	Hidrolisat protein tulang ikan patin (%)*/Hidrolizate protein patin (<i>Pangasius</i>) bones (%) *	EAA **
Alanina	2.30±2.29	2.35	-
Arginina	1.55±0.47	1.4	-
Asam aspartat	3.27±1.05	1.85	-
Asam glutamat	6.27±2.13	3.5	-
Fenilalanina	2.03±0.46	0.81	-
Glisina	4.04±1.38	1.75	-
Histidina	0.49±0.09	0.44	1.6
Isoleusina	1.84±0.49	0.58	1.3
Leusina	2.72±1.67	1.4	1.9
Lisina	2.30±1.08	4.8	1.6
Metionina	0.75±0.13	1.25	1.7
Serina	1.21±0.34	1.4	-
Tirosina	0.84±0.22	1.15	-
Treonina	1.05±0.33	1.2	0.9
Valina	1.95±0,60	0.87	1.3
Total asam amino	32.68	25.65	

*Amiza *et al.* (2013)

** asam amino esensial yang disarankan untuk orang dewasa (FAO/WHO 1990)

asam amino penyusunnya (Sinlae *et al.* 2015). Suatu protein yang dapat menyediakan asam amino esensial dalam suatu komposisi yang hampir menyamai kebutuhan manusia, mempunyai mutu yang tinggi.

Produk hidrolisat protein limbah filet ikan patin mengandung 8 asam amino esensial yaitu histidina, treonina, metionina, valina, fenilalanina, isoleusina, leusina dan lisina serta 7 asam amino nonesensial yaitu

asam aspartat, asam glutamat, serina, glisina, arginina, alanina, dan tirosina. Asam amino yang memiliki kandungan tertinggi adalah asam glutamat yaitu sebesar 6,27%. Asam amino yang memiliki kandungan terendah yaitu histidina sebesar 0,49%. Total asam amino pada hidrolisat protein limbah filet ikan patin yaitu sebesar 52,68%. Total asam amino pada hidrolisat protein limbah filet ikan patin lebih tinggi apabila dibandingkan dengan total asam amino hidrolisat protein tulang ikan patin pada penelitian Amiza *et al.* (2013).

Asam amino esensial pada hidrolisat protein tulang ikan patin umumnya lebih tinggi (kecuali untuk histidin dan leusin) dibandingkan dengan pola yang disarankan untuk manusia dewasa oleh FAO/WHO. Hal tersebut membuktikan bahwa komposisi asam amino pada hidrolisat protein limbah filet ikan patin memenuhi persyaratan standar tersebut sehingga dapat disarankan sebagai sumber nutrisi asam amino esensial yang baik sebagai bahan makanan. Charoenphun *et al.* (2013) menjelaskan bahwa kapasitas pengikatan kalsium oleh peptida dipengaruhi oleh kandungan asam amino penyusun protein.

Kroll (1984) menjelaskan bahwa aktivitas pengikatan kalsium diidentifikasi sebagai asosiasi rantai karboksil dari asam aspartat dan asam glutamat dengan kelompok imidazol dari histidin. Nie *et al.* (2014) juga menjelaskan bahwa pengikatan kalsium oleh hidrolisat protein ikan nila dikarenakan kalsium yang terkoordinasi dengan gugus karboksil dari asam glutamat dan karbonil oksigen dari ikatan peptida. Bao *et al.* (2008) juga menjelaskan bahwa asam glutamat pada hidrolisat protein kedelai mempunyai peranan yang penting dalam kapasitas pengikatan kalsium. Gifford *et al.* (2007) menyatakan ligan Ca^{2+} umumnya disediakan oleh rantai samping dua asam amino yaitu asam aspartat dan asam glutamat.

KESIMPULAN

Hidrolisat protein ikan dari limbah filet ikan patin mempunyai aktivitas pengikatan kalsium. Aktivitas kalsium tertinggi terdapat pada hidrolisa dengan konsentrasi 6%.

DAFTAR PUSTAKA

- Amiza MA, Kong YL, Faazaz AL. 2012. Effect of hydrolysis on physicochemical properties of cobia (*Rachycentron canadum*) frame hydrolysate. *International Food Research Journal*. 19(1): 199-206.
- Amiza MA, Ow YW, Faazaz AL. 2013. Physicochemical properties of silver catfish (*Pangasius sp.*) frame hydrolysate. *International Food Research Journal*. 20(3): 1255-1262.
- [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.
- Bao XL, Lv Y, Yang BC, Ren CG, Guo ST. 2008. A study of the soluble complexes formed during calcium-binding by soybean protein hydrolysates. *Journal of Food Science*. 73(3): 117-122.
- Chalamaiah M, Kumar B D, Hemalatha R, Jyothirmayi T. 2012. Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. *Food Chemistry (Birch ed.)* 135(4): 3020-3038.
- Charoenphun N, Benjamas C, Nualpun S, Wirote Y. 2013. Calcium-binding peptides derived from tilapia (*Oreochromis niloticus*) protein hydrolysate. *European Food Research and Technology*. 236(1): 57-63.
- Gifford JL, Walsh MP, Vogel HJ. 2007. Review Article : Structure and metal ion binding properties of the Ca^{2+} binding helix-loop-helix EF-Hand motifs. *Biochemical Journal*. 405(2): 199-221.
- Haslaniza H, Maskat MY, Wan AWM, Mamot S. 2010. The effect of enzyme concentration, temperature, and incubation time on nitrogen content and degree of hydrolysis of protein precipitate from cockle (*Anadara granosa*) meat waste water. *International Food Research Journal*. 17: 147-152.
- Hastarini E, Dedi F, Irianto HE, Budijanto S. 2012. Karakteristik minyak ikan dari limbah pengolahan filet ikan patin siam dan patin jambal. *AGRITECH*. 32(4): 403-410.

- Hoa MX, Lam TB. 2008. Optimization of enzymatic hydrolysis of viscera of *Pangasiidae* to obtain calcium-binding protein hydrolysate. *Vietnam Journal of Agriculture and Rural Development*. 38: 124-132.
- Hoyle NT, Merritt JH. 1994. Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*). *Journal of food science*. 59(1): 76-79.
- Jin GY, Fu WW, Ma MH. 2011. Preparation and structure characterization of soluble bone collagen peptide chelating calcium. *African Journal of Biotechnology*. 10(50): 10204-10211.
- Jung WK, Kim SK. 2007. Calcium-binding peptide derived from pepsinolytic hydrolysates of hoki (*Johnius belengerii*) frame. *European Food Research and Technology*. 224: 763-767.
- [KKP] Kementerian Kelautan dan Perikanan. 2013. Laporan tahunan direktorat produksi tahun 2013. www.kkp.go.id. (17 Agustus 2016).
- [KKP] Kementerian Kelautan dan Perikanan. 2015. Volume produksi perikanan budidaya. www.kkp.go.id. (17 Agustus 2016).
- Litaay M. 2005. Peranan nutrisi dalam siklus reproduksi abalone. *Oseana*. 1(3): 1-7.
- Mardiyah S, Sartika RAD. 2014. Gangguan kepadatan tulang pada orang dewasa di daerah urban dan rural. *Jurnal Kesehatan Masyarakat Nasional*. 8(6): 272-279
- Mendez AIR, Hernandez CF, Lalanne GM, Sanches HH, Ortiz GD, Martinez CJ. 2015. Production of calcium and iron binding peptides by probiotic strains of *Bacillus subtilis*, *B. Clausii* and *B. Coagulans* GBI-30. *Revista Mexicana de Ingenieria Quimica*. 14(1): 1-9.
- Nie R, Liu Y, Liu Z. 2014. The calcium-binding activity of fish scale protein hydrolysates. *Journal of Agricultural Chemistry and Environmental*. 3(1B): 11-15.
- Nurhayati T, Nurjanah, Casti HS. 2013. Karakterisasi hidrolisat protein ikan lele dumbo (*Clarias gariepinus*). *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 16(3): 207-214.
- Pigott GM, Tucker BW. 1990. *Utility Fish Flesh Effectively While Maintaining Nutritional Qualities. Seafood Effects of Technology and Nutrition*. New York (US). Marcel Decker Inc.
- Purbasari D. 2008. Produksi dan Karakterisasi Hidrolisat Protein dari Kerang Mas Ngur (*Atactodea striata*). [Skripsi]. Bogor (ID) : Institut Pertanian Bogor.
- Sathivel S, Witoon P, Casey CG, Joan MK, Steven L. 2012. FA composition of crude oil recovered from catfish viscera. *JAOCS*. 79(10): 989-992.
- Schmid FX. 2001. Biological Macromolecules: UV-visible Spectrophotometry. www.els.net (21 September 2016).
- Sharma S, Raghvendar S, Shashank R. 2011. A review: bioactive peptides. *Bioautomation*. 14(4): 223-250.
- Sinlae RN, Suwiti NK, Suardana IW. 2015. Karakteristik protein dan asam amino daging sapi bali dan wagyu pada penyimpanan suhu dingin 4°C. *Buletin Veteriner Udayana*. 7(2): 146-156.
- Thuy CX, Lam TB, Commick K. 2015. Biochemical and functional properties of fish protein isolate from *Pangasius hypophthalmus* byproduct as influenced by time and degree of hydrolysis. *International Food Research Journal*. 22(1): 337-343.
- Utomo BSB, Suryaningrum TD, Hrianto HR. 2014. Optimization of enzymatic hydrolysis of protein hydrolysate processing from waste of catfish filet production. *Squalen Bulletin of Marine And Fisheries Postharvest and Biotechnology*. 9(3): 107-114.