

EKSTRAKSI, KARAKTERISASI DAN AKTIVITAS ANTIOKSIDANHYALURONAN DARI *VITREOUS HUMOR* MATA TUNA SIRIP KUNING (*Thunnus albacares*)

Wini Trilaksani*, Bambang Riyanto, Tri Wahyuningsih

Departemen Teknologi Hasil Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor

Jalan Agatis Kampus IPB Dramaga, Bogor, Jawa Barat 16680

Telp. (0251) 8622909-8622907, Fax. (0251) 8622907

*Korespondensi : wtrilaksani@gmail.com

Diterima: 1 Februari 2019 /Disetujui: 18 Desember 2019

Cara sitasi : Trilaksani W, Riyanto B, Wahyuningsih T. 2019. Ekstraksi, karakterisasi dan aktivitas antioksidan hyaluronan dari *vitreous humor* mata tuna sirip kuning (*Thunnus albacares*). *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 22(3): 548-561.

Abstrak

Vitreous humor merupakan bagian mata tuna yang berperan untuk menjaga kecerahan mata dan mengandung sel hyalosit serta memiliki fungsi produksi hyaluronan. Hyaluronan diduga berperan sebagai antioksidan untuk mencegah kerusakan asam lemak tidak jenuh pada mata ikan tuna oleh radikal bebas. Antioksidan hyaluronan dari *vitreous humor* mata ikan tuna belum banyak diteliti. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh ekstrak antioksidan hyaluronan yang terdapat pada *vitreous humor* mata ikan tuna dan menentukan karakteristik fisik dan kimianya. Ekstraksi hyaluronan dari *vitreous humor* mata ikan tuna terdiri dari tahap presipitasi, sentrifugasi, proses hidrolisis enzimatis, *defatting*, dialisis, dan pengeringan beku. Aktivitas antioksidan hyaluronan ditentukan dengan metode 1,1-difenil-2-picrylhydrazyl2,2-azinobis (DPPH), 3-ethylbenzo-thiozoline-6-sulfonic acid (ABTS), dan *ferric reducing antioxidant power* (FRAP). *Vitreous humor* mata ikan tuna memiliki proporsi 31% dari mata, nilai pH $6,91\pm 0,01$, viskositas $195,56\pm 12,86$ cP, air $98,09\pm 0,49\%$, dan asam amino dominan berupa asam glutamat $932,06\pm 3,80$ mg/L. Rendemen hyaluronan hasil ekstraksi dari *vitreous humor* mata ikan tuna berkisar $0,005\pm 0,001\%$. Aktivitas antioksidan hyaluronan pada radikal DPPH yang diperoleh adalah IC_{50} $25,52\pm 0,22$ mg/mL, persen inhibisi hyaluronan konsentrasi 0,5 mg/mL pada radikal ABTS $1,92\pm 0,08\%$, dan nilai kapasitas reduksi dengan metode FRAP $9,34\pm 0,55$ μ M/g sampel. Ketiga hasil pengujian aktivitas antioksidan tersebut (DPPH, ABTS dan FRAP) mengindikasikan bahwa aktivitas antioksidan hyaluronan dari *vitreous humor* mata ikan tuna masih lemah

Kata kunci: asam lemak tidak jenuh, ekstraksi, kapasitas reduksi, radikal ABTS, radikal DPPH

Characterization and Antioxidant Activity of Hyaluronan from Vitreous Humor of Yellowfin Tuna Eye (Thunnus albacares)

Abstract

Vitreous humor is a part of the tuna fish eye that plays a role in maintaining the brightness of the eye and contains hyalocytes having function to produce hyaluronan. Hyaluronan is thought as an antioxidant to prevent unsaturated fatty acids damage in tuna fish eye caused by free radicals. Hyaluronan from vitreous humor tuna fish eye has not been widely studied. This study was aimed to extract the hyaluronan found in vitreous humor of tuna fish eye and determine its characteristics. Extraction of hyaluronan consisted of precipitation, centrifugation, enzyme digestion, defatting, dialysis, and freeze drying. Antioxidant activity was determined by three methods comprising 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl2,2-azinobis (DPPH), 3-ethylbenzo-thiozoline-6-sulfonic acid (ABTS), and ferric reducing antioxidant power (FRAP). Vitreous humor tuna fish eye had a proportion of 31% of eye, pH value 6.905 ± 0.0083 , viscosity 195.56 ± 12.86 cP, water $98.09\pm 0.49\%$, and glutamic acid 932.06 ± 3.80 mg/L. The hyaluronan yield was about $0.005\pm 0.001\%$. The IC_{50} antioxidant activity of hyaluronan against DPPH was 25.52 ± 0.22 mg/mL while the inhibition capacity on ABTS was $1.92\pm 0.08\%$ and the ferric reduction capacity was 9.34 ± 0.55 μ M/g. These results indicates that the antioxidant activity of hyaluronan from vitreous humor tuna fish eye is low.

Keywords: ABTS radicals, DPPH radicals, extraction, the reduction capacity value, unsaturated fatty acids

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan salah satu dari enam negara eksportir tuna terbesar di dunia (Globefish 2017). Produksi tuna Indonesia tahun 2017 adalah 198,131 ton, dengan empat kategori produk olahan utama yaitu tuna segar (*fresh tuna*), tuna loin (*chilled tuna*), tuna beku (*frozen tuna*) dan tuna yang dikalengkan (*canned tuna*) (KKP 2018). Efisiensi produksi industri pengolahan tuna loin umumnya 35-50% dari bahan baku (Toppe 2017). Proporsi limbah pengolahan industri ikan tuna di Indonesia mencapai 50,1% dari total bahan baku tuna *fresh* ataupun *frozen* (Rinjani 2017), kegiatan industri pengolahan perikanan tuna menghasilkan produk sampingan yang terdiri atas daging hitam 10-13%, kepala 17-19%, isi perut 7,05%, tulang 6%, dan kulit 5-7% dari total berat badan ikan tuna yang diproduksi (Gamarro *et al.* 2013). Kepala tuna memiliki proporsi mencapai 18% (Prasertan dan Prachumratana 2008), mengandung minyak 7,01% dengan kandungan *docosahexaenoic acid* (DHA) yang tinggi dibandingkan usus dan hati (Khoddami *et al.* 2012)

Mata tuna memiliki kandungan lemak 12,04%, protein 10,17%, dan abu 2,09%. Asam lemak pada mata tuna memiliki komposisi asam lemak tidak jenuh yang tinggi seperti *docosahexaenoic acid* (DHA) 35%, *eicosapentaenoic acid* (EPA) 7%, asam arakidonat 3,6%, dan asam linoleat 1,3% (Renuka *et al.* 2016). Protein hidrolisat mata tuna dilaporkan mengandung aktivitas antioksidan (Mutamimah *et al.* 2018). Mata tuna dari tuna mata besar (*big eye tuna*) memiliki potensi sebagai sumber atau bahan baku hyaluronan, namun belum pernah dikembangkan (Amagai *et al.* 2009).

Mata merupakan organ indra yang berfungsi sebagai penglihatan bagi hewan maupun manusia. Mulai dari anterior sampai posterior, mata secara anatomi meliputi kornea, *aqueous humor*, iris, lensa, *vitreous humor*, retina, dan sklera. *Vitreous humor* adalah material yang seperti gel yang tidak berwarna dan transparan yang mengisi *vitreous chamber*. *Vitreous humor* mempunyai sifat seperti gel yang berperan dalam menjaga kecerahan mata dengan menghilangkan pengotor. Fatt dan Weissman (1992)

mengemukakan bahwa kadar air *vitreous humor* mencapai 99% yang berperan pada proses difusi dan menghubungkan pergerakan molekul kecil sebagai nutrisi sekeliling jaringan. *Vitreous humor* mengandung sel hyalosit yang berfungsi memproduksi hyaluronan. *Vitreous humor* merupakan jaringan ikat yang tersusun dari protein inti, kolagen dan glikosaminoglikan yang saling berikatan (Lapcik *et al.* 1990).

Hyaluronan merupakan salah satu glikosaminoglikan yang terdapat pada jaringan ikat *vitreous humor* (Lapcik *et al.* 1990). Hyaluronan terdiri atas disakarida berulang (β 1-3 D-N-asetilglukosamin, β 1-4 D-asam glukuronat) dengan berat molekul yang tinggi berkisar 105-107 Da (Garg dan Hales 2004). Hyaluronan berperan menangkap kerusakan dari radikal bebas dan zat kimia lainnya. Hyaluron terdegradasi oleh spesies oksigen dan nitrogen reaktif (*Reactive Oxygen Species* (ROS)/*Reactive Nitrogen Species* (RNS)) yang berperan melindungi sel sehingga radikal bebas tidak merusak sel lainnya. Hyaluronan yang telah rusak disintesis kembali untuk mengembalikan kondisi yang homeostatis (Cowman *et al.* 2015). Radikal bebas yang umumnya menyerang sel berupa spesies radikal superoksida (O_2^-), hidrogen peroksida (H_2O_2) dan radikal hidroksil (OH^-) yang menyebabkan kerusakan yang kronis (Moseley *et al.* 2003). Hyaluronan berinteraksi dengan radikal pada C(1) cincin monosakarida, C(3) dari N-asetilglukosamin, atau C(4) dari cincin asam glukuronat (Soltés *et al.* 2006). Aktivitas antioksidan hyaluronan memiliki potensi untuk dilakukan pengkajian. *Vitreous humor* yang mengandung hyaluronan diduga dapat melindungi asam lemak tidak jenuh seperti EPA dan DHA yang ada pada bagian mata ikan dari radikal bebas. Penelitian ini bertujuan untuk mengekstraksi antioksidan hyaluronan yang terdapat pada *vitreous humor* mata ikan tuna dan menentukan karakteristik fisik dan kimianya.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian berupa mata ikan tuna beku jenis tuna *Thunnus albacares* yang diperoleh dari

industri pengolahan ikan tuna Muara Baru, Jakarta Utara, yang berasal dari penangkapan perairan Samudera Hindia pada bulan Januari sampai April tahun 2017, kemudian disimpan beku suhu -18°C . Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi adalah setilpiridinium klorida (CPC) (Merck) 3%, natrium klorida (NaCl) 0,4 M, kalium asetat 10%, etanol pro analis, *buffer* asetat 0,1 M (pH 4,5 dan 3,6), asam trikloroasetat (TCA) 10%, akuades, aseton, enzim papain komersil (Merck), dan kantung dialisis ukuran 5 nm (5 KDa) (Sigma aldrich). Bahan pengujian antioksidan berupa asam askorbat 98,09%, metanol pro analis, 1,1-difenil-2-picrylhydrazyl (DPPH Merck), 2,2-azinobis (3-ethylbenzo-thiozoline-6-sulfonic acid) (ABTS Sigma Aldrich), kalium persulfat 99%, Besi (III) klorida (FeCl_3) (Merck), 2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ), asam klorida (HCl), dan FeSO_4 (Merck).

Alat yang digunakan berupa timbangan analitik (Satorius BS-24S), kertas saring nilon 100 mesh, pH meter (Thermo Scientific), viskometer Brookfield model LV (spindle no 2, 50 rad/sec), *centrifuge* (Himac CR 21G), *ultra performance liquid chromatography* (UPLC), *waterbath shaker* (Yamato), dan Bruker Tensor 37 FT-IR *spectrometer* (sumber sinar mid-IR 4000-400 cm^{-1} , *beamsplitter* KBr) dan spektrofotometri UV-VIS (Optima).

Metode Penelitian

Pengambilan dan karakterisasi mata ikan tuna

Mata ikan tuna yang diperoleh merupakan hasil samping industri pengolahan tuna beku, yang diambil, dikumpulkan selama 90 hari dan disimpan dalam kondisi beku pada suhu -18°C . Mata ikan tuna masih dalam keadaan beku pada wadah styrofoam dikirim ke laboratorium dengan perjalanan selama 3 jam. Mata ikan tuna disimpan kembali dalam keadaan beku dan dipertahankan pada suhu -15°C sampai -18°C hingga proses preparasi. Spesifikasi mata tuna sebelum preparasi disesuaikan dengan SNI 4110-2014 tentang sensori ikan beku. Karakterisasi mata ikan tuna yang dilakukan sebelum preparasi meliputi berat mata, diameter mata, proporsi bagian mata, dan kenampakan bentuk mata.

Preparasi dan karakterisasi *vitreous humor*

Preparasi *vitreous humor* berdasarkan Amagai *et al.* (2009), mata ikan tuna yang masih dalam keadaan beku dibelah. Pembelahan pertama dilakukan pada bagian belakang mata. Pengambilan *vitreous* beku dilakukan dengan membuang bagian daging dan sklera pada bagian posterior. *Vitreous* yang diperoleh dicairkan pada udara terbuka (*air thawing*) dengan suhu berkisar $25-27^{\circ}\text{C}$ selama tiga jam, kemudian dilakukan penyaringan dengan kertas saring nilon ukuran 100 mesh. Filtrat yang diperoleh ditempatkan di gelas piala ditutup dengan aluminium foil untuk disimpan pada refrigerator suhu 4°C .

Karakterisasi *vitreous humor* yang dilakukan meliputi kenampakan *vitreous humor* beku, pengamatan *vitreous humor* dengan *Scanning Electron Microscope* (SEM), viskositas, analisis asam amino (Nollet 1996), derajat keasaman (pH), analisis proksimat yang meliputi kadar protein (AOAC 960.52 1999), kadar lemak (BSN 1992), kadar air (BSN 1992), dan kadar abu (BSN 1992).

Ekstraksi hyaluronan

Ekstraksi hyaluronan mengacu Amagai *et al.* (2009) dengan modifikasi, yang diawali dengan penyaringan *vitreous humor* dengan nilon 100 mesh. Filtrat yang diperoleh ditambahkan larutan setilpiridinium klorida (CPC) 3% (1:6 v/v) lalu dilakukan pengadukan dan didiamkan selama 30 menit sehingga terbentuk presipitat yang berupa mukopolisakarida. Pemisahan presipitat dilakukan dengan penyaringan menggunakan nilon 100 mesh. Presipitat yang diperoleh ditambahkan larutan 0,4M NaCl (1:9 v/v) untuk memisahkan hyaluronan. Supernatan yang diperoleh didiamkan 30 menit kemudian dipisahkan dengan sentrifugasi (6.000 x g, 15 menit, suhu 4°C). Proses tersebut diulang dua kali. Supernatan yang diperoleh ditambahkan larutan 10% kalium asetat dalam etanol 96% (1:2 v/v) dalam kondisi dingin dan didiamkan selama 12 jam kemudian dipisahkan dengan sentrifugasi (6000xg, 15 menit, suhu 4°C). Proses menghasilkan hyaluronan kasar.

Penghilangan protein (deproteinisasi)

dilakukan secara enzimatik. Presipitat yang diperoleh dilarutkan dengan larutan *buffer* 0,1 M (pH 4,5) (1g/20 mL) yang mengandung enzim papain (0,4%/g sampel). Proses enzimatik dilakukan selama 24 jam pada suhu 60°C pada *waterbath shaker*. Hidrolisat hyaluronan kasar diinaktivasi sesuai Volpi dan Maccari (2013) (suhu 100°C, 10 menit) lalu ditambahkan larutan TCA 10% (1:1 v/v) sesuai Polson *et al.* (2003) untuk mengendapkan protein. Larutan didiamkan selama 12 jam pada kondisi dingin lalu dipisahkan dengan sentrifugasi (6.000 x g, 15 menit, suhu 4°C) sehingga diperoleh supernatan.

Penghilangan lemak dilakukan dengan menambahkan aseton ke dalam supernatan yang diperoleh (1:1 v/v) untuk memisahkan lemak dari hyaluronan selama 18 jam pada suhu 4°C lalu dipisahkan dengan sentrifugasi (9.000 x g, 15 menit, suhu 4°C). Presipitat dipisahkan dari supernatan kemudian ditambahkan akuades dan didialisis dengan kantung dialisis selama 48 jam. Hyaluronan dikeringbekukan selama 20 jam (suhu -47,9°C, tekanan 10,8 Pa). Isolat disimpan kering.

Karakterisasi hyaluronan

Hyaluronan yang diperoleh dari ekstraksi *vitreous humor* dilakukan karakterisasi untuk membuktikan keberadaan hyaluronan. Karakterisasi hyaluronan meliputi persen rendemen, dan analisis gugus fungsi dengan *Fourier Transform Infra Red* (FTIR) mengacu *American Society for Testing Material*(ASTM) E1252 (2013).

Pengujian aktivitas antioksidan

Pengujian aktivitas antioksidan *vitreous humor* dan hyaluronan dilakukan dengan menggunakan metode 2,2-azinobis (3-ethylbenzo-thiozoline-6-sulfonic acid) (ABTS) (Re *et al.* 1999), 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) (Brand-Williams *et al.* 1995) dan *Ferric Reducing Antioxidant Power*(FRAP) (Benzie dan Strain 1996).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Proporsi dan Visual Mata Ikan Tuna dan *Vitreous Humor*

Ikan tuna berasal dari perairan Samudera Hindia, ditangkap/didaratkan nelayan

Indonesia terdiri dari dua jenis tuna, yaitu tuna ekor kuning (*Thunnus albacares*) dan tuna mata besar (*Thunnus obesus*). Berat mata ikan tuna dalam kondisi beku yaitu 218,3±39 g. Renuka *et al.* (2016) menyampaikan berat mata tuna ekor kuning yang ditangkap pada musim *pre-monsoon* dari perairan Aroor, Kerala adalah 120±3 g. Proporsi mata ikan tuna yang terbesar berupa daging 34%, *vitreous* 31%, dan bagian lain 25%, yang meliputi kornea mata, kulit mata, dan bagian yang tidak teridentifikasi (*Figure 1*). Bagian lensa terdapat kapsul lensa yang merupakan membran kolagen yang berpotensi menjadi alternatif sumber kolagen (Fatt dan Weissman 1992). *Vitreous humor* dapat dimanfaatkan sebagai sumber hyaluronan (Amagai *et al.* 2009, Murado *et al.* 2012).

Vitreous humor mata ikan tuna memiliki warna kecokelatan dan membentuk setengah bola dengan berat *vitreous* beku 75±16,8 g. Diameter mata tuna adalah 7,149±0,523 cm, sehingga diperkirakan berisi 76,485 mL (*Figure 1*). Bagian *vitreous humor* mata ikan tuna memiliki ukuran yang lebih besar dari mata mamalia. Kedalaman *vitreous humor* mata monyet dan anjing 11,3 mm dan 10,02 mm (Lapuerta dan Schein 1995, Mutti *et al.* 1999).

Vitreous humor dari mata ikan yang masih segar berwarna bening transparan karena kandungan air yang besar (Donati *et al.* 2014). *Vitreous humor* mata tuna yang diperoleh memiliki karakteristik bening kecokelatan yang diduga telah tercampur darah dan terjadi reaksi pencokelatan. Hasil pengamatan dengan SEM menunjukkan adanya serabut yang diduga merupakan kolagen. Kolagen pada *vitreous humor* berikatan dengan hyaluronan. *Vitreous humor* mengandung makromolekul struktur berupa hyaluronan(HA), proteoglikan, kolagen, dan protein non kolagen (Bishop 1996).

Karakteristik *Vitreous Humor* Viskositas

Viskositas *vitreous humor* mata ikan tuna pada penelitian ini yaitu 195,56±12,86cP. Hal ini menunjukkan bahwa viskositas *vitreous humor* mata tuna pada penelitian ini rendah dan terlihat encer. Suri dan Banerjee

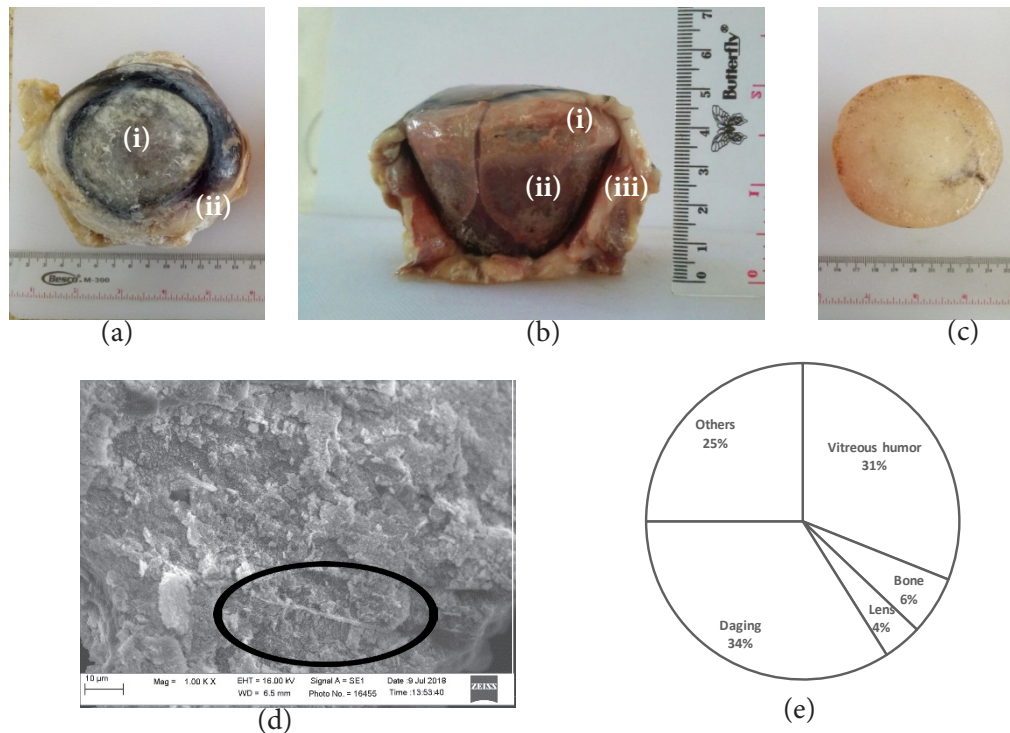


Figure 1 The visual form of frozen tuna fish eye (1a (i) cornea, (ii) sclera), frozen tuna fish eye appear side (1b (i) vitreous, (ii) sclera, (iii) meat), & frozen vitreous (1c), visualization vitreous humor of tuna fish eye with SEM magnification 1000x with ellipsis area show the collagen (1d), and proportion of tuna fish eye (1e).

(2006) melaporkan viskositas *vitreous humor* mata kambing lebih dari 4000 cP yang mengandung hyaluronan 15 mg/mL. Amagai *et al.* (2009) melaporkan bahwa satu mata tuna mengandung 10,5 mg hyaluronan. Konsentrasi HA pada *vitreous humor* menyebabkan *vitreous humor* memiliki sifat viskoelastis yang berperan dalam menjaga bentuk mata. Hyaluronan pada pH netral akan membentuk *stiffed random coil* karena ikatan hidrogen antara sakarida yang berdekatan serta beberapa efek dari tolakan elektrostatis antara gugus karboksil yang menyebabkan hyaluronan memiliki ikatan intramolekular yang tinggi sehingga membentuk struktur gel yang stabil (Morris *et al.* 1980).

Struktur *vitreous humor* dipengaruhi oleh interaksi hyaluronan dan kolagen. Donati *et al.* (2014) menjelaskan struktur molekul *vitreous* mengandung komponen utama hyaluronan (HA) dan berbagai tipe kolagen yang membentuk struktur *gelatinous*. Fungsi hyaluronan menstabilkan jaringan kolagen sehingga membentuk sifat viskoelastis.

Vitreous humor mata ikan tuna pada penelitian ini diduga telah terjadi likuifaksi yaitu perubahan dari gel ke cair (Figure 3b). Likuifaksi terjadi karena perubahan interaksi antara hyaluronan dan kolagen yang ditandai dengan benang kolagen yang membentuk agregat, sementara konsentrasi hyaluronan sama pada bentuk cair maupun gel (Bishop 1996) (Figure 2). Likuifaksi *vitreous humor* terjadi apabila kolagen berkurang baik melalui filtrasi, sentrifugasi, maupun degradasi kolagen oleh enzim (Sebag 1998).

Komposisi kimia

Penentuan komposisi kimia *vitreous humor* mata ikan tuna mengacu pada SNI 01-2891-1992 tentang Cara Uji Makanan dan Minuman Standar Nasional Indonesia (Table 1). Komponen tertinggi pada *vitreous humor* berupa air. Scott (1992) menyampaikan bahwa *vitreous humor* mengandung 97% air. Bishop (1996) melaporkan bahwa *vitreous humor* mengandung hyaluronan yang berperan mengikat air. Kadar air yang tinggi

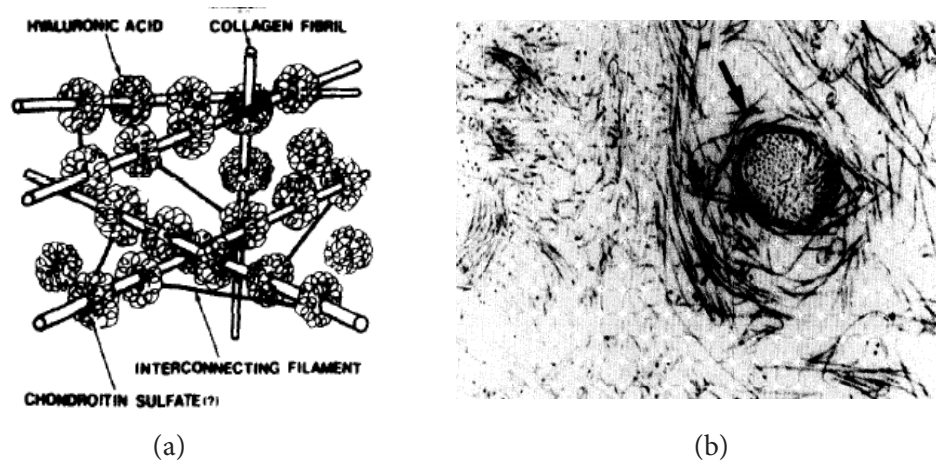


Figure 2 Ultrastructural interaction of collagen and hyaluronan in the vitreous humor (2a) and ultrastructural liquefaction of vitreous humor (the arrow shows the collagen that forms aggregate) (2b) (Sebag 1998)

pada *vitreous humor* berhubungan dengan fungsinya yaitu mengisi bagian tengah mata, memodulasi pertumbuhan mata, menjaga transparansi media, berperan pada proses penglihatan, dan mekanisme akomodasi pada mata (Donati *et al.* 2014). *Vitreous humor* juga berperan pada proses difusi dan menghubungkan pergerakan molekul kecil sebagai nutrisi sekeliling jaringan (Fatt dan Weissman 1992).

Kadar abu yang terdapat pada *vitreous humor* lebih tinggi dari pada lemak, protein, dan karbohidrat karena adanya kandungan mineral *vitreous humor* (Duke-Elder 1929). Mineral yang terkandung di dalam *vitreous humor* berupa magnesium, kalium, natrium, dan kalsium (Farmer *et al.* 1985). Natrium pada hewan vertebrata berperan dalam mengatur sel baik pada depolarisasi maupun hiper depolarisasi yang tergantung pada kondisi gelap dan terang. Kalium dan natrium dibutuhkan untuk fungsi sistem saraf (Morgano *et al.* 2011). Magnesium (Mg)

berfungsi sebagai kofaktor reaksi enzimatik (Flemming 1989).

Kadar protein menunjukkan hasil yang lebih besar dibandingkan karbohidrat dan lemak. Hal ini dikarenakan *vitreous humor* mengandung makromolekul struktur berupa proteoglikan, kolagen, dan protein non kolagen (Bishop 1996). Kadar karbohidrat pada *vitreous humor* menunjukkan adanya hyaluronan yang komponen utamanya berupa disakarida yang berulang (Amagai *et al.* 2009). Kadar lemak pada *vitreous humor* merupakan komponen yang paling rendah dibandingkan komponen lainnya. Kandungan lemak pada *vitreous humor* berperan pada metabolisme sel (Donati *et al.* 2014).

Komposisi asam amino

Asam amino *vitreous humor* mata ikan tuna yang dapat diidentifikasi sejumlah 14 terdiri atas treonina, prolina, tirosina, leusina, asam aspartat, lisina, glisina, arginina, alanina, valina, isoleusina, fenilalanina, asam

Table1 Chemical composition of tuna eye vitreous humor

Vitreous humor of tuna fish eye chemical component	Content (%)	
	Wet base	Dry base
Moisture	98.09±0.49	-
Ash	0.97±0.25	50.79
Protein	0.59±0.09	30.89
Lipid	0.14±0.02	7.33
Carbohydrate content (by difference)	0.21±0.14	11.14

Table 2 Amino acid profile of vitreous humor of tuna eye

Amino acids	Concentration(mg/L)
L-Threonine*	267.38±0.16
L-Proline	229.54±0.01
L-Tyrosine*	311.38±0.95
L-Leucine*	395.30±1.89
L-Aspartic acid	515.04±0.94
L-Lysine*	476.47±0.23
Glycine	353.29±1.80
L-Arginine*	365.17±0.01
L-Alanine	278.01±0.26
L-Valine*	316.69±0.65
L-Isoleucine*	240.10±1.50
L-Phenylalanine*	342.20±0.46
L-Glutamic acid	932.06±3.80
L-Serine	277.57±0.57

Note : * essential amino acid

glutamat, dan serina. Komposisi asam amino diperoleh dari pengujian menggunakan *Ultra Performance Liquid Chromatography* (UPLC) metode Nollet (1996) pada *vitreous humor* (Table 2).

Asam amino tertinggi pada *vitreous humor* mata ikan tuna yaitu asam aspartat, asam glutamat, dan lisina. Asam glutamat dan asam aspartat merupakan asam amino tertinggi pada mata ikan tuna sirip kuning (Renuka *et al.* 2017). Asam glutamat berperan pada proliferasi sel yang terjadi di *vitreous humor* (Peng *et al.* 2013). Asam aspartat berperan mengatur ekspresi gen, transportasi nutrisi, dan metabolisme sel, sementara lisina berperan dalam sintesis protein (Falco *et al.* 2016). Asam amino glisina dan prolina pada *vitreous* mata ikan tuna berturut-turut 6,67% dan 4,33% yang lebih rendah dari *vitreous humor* mata sapi yaitu 18% glisina, 8,4% prolina, dan 15,4% hidrosiprolina (Young dan Williams 1954). Asam amino prolina dan glisina yang rendah diduga karena *vitreous humor* mengalami likuifaksi. Likuifaksi terjadi karena perubahan interaksi antara hyaluronan dan kolagen yang ditandai dengan benang kolagen yang membentuk agregat (Bishop

1996). Gel *vitreous humor* dapat terjadi likuifaksi karena kehilangan kolagen melalui filtrasi, sentrifugasi, atau perusakan kolagen dengan enzim (Sebag 1998). Kolagen dan hyaluronan membentuk struktur *gelatinous* pada *vitreous humor* (Donati *et al.* 2014)

Derajat Keasaman

Derajat keasaman (pH) *vitreous humor* 6,905±0,083. Nilai pH *vitreous humor* mata ikan tuna terlihat cenderung mendekati nilai 7 atau netral diduga karena hampir 97% *vitreous* mengandung air sehingga nilai pH cenderung mendekati netral. Nilai pH *vitreous* sapi segar 7,8 (Meyer dan Palmer 1934), pH *vitreous* manusia 7,0-7,4 (Soman dan Banerjee 2003); nilai pH *vitreous humor* kelinci berkisar 7,23 sampai 7,37, dan *vitreous humor* kera 7,25-7,29. Nilai pH *vitreous humor* dapat juga berubah karena pengaruh suhu. Nilai pH *vitreous humor* kera yang disimpan pada suhu 37°C turun hingga 6,91 setelah 30 menit dan 6,86 setelah 90 menit. Hal ini juga terjadi pada pH *vitreous humor* kelinci menjadi 6,83 setelah 30 menit dan 6,54 setelah 90 menit. Nilai pH *vitreous humor* kera yang disimpan pada suhu 4°C, meningkat pada

7,10 setelah 30 menit dan 7,38 setelah 90 menit (Lorget *et al.* 2015).

Nilai pH pada *vitreous humor* dapat dipengaruhi oleh waktu dan suhu penyimpanan. Nilai pH pada *vitreous humor* mata ikan tuna lebih rendah dari pH *vitreous humor* kelinci dan kera diduga karena meningkatnya produksi asam laktat pada *vitreous humor* mata ikan tuna (Lorget *et al.* 2015). *Vitreous humor* mengandung glukosa 5 hingga 10% yang berikatan dengan protein (glikoprotein) dengan total glikoprotein dalam tubuh 20% dari jumlah protein *nonkolagenous* pada *vitreous humor* (Sebag 1989). Ikatan glikosidik pada hyaluronan yang terputus karena radikal bebas juga dapat meningkatkan tingkat keasaman sehingga nilai pH akan menurun (Kim *et al.* 2008).

Karakteristik Hyaluronan

Rendemen

Rendemen hyaluronan yang diperoleh adalah $0,005 \pm 0,001\%$ dihitung dari berat hyaluronan serbuk yang diperoleh dibandingkan dengan berat *vitreous humor* beku (Figure 3a). Berat hyaluronan serbuk yang diperoleh 0,06 g per liter *vitreous humor* mata ikan tuna yang diperoleh dari ekstraksi (Figure 3b). Murado *et al.* (2012) memperoleh 0,055 g hyaluronan per liter *vitreous humor* mata ikan todak (*swordfish*) dan 0,3 g hyaluronan per liter *vitreous humor* mata ikan hiu. Hyaluronan pada penelitian ini lebih rendah dibandingkan penelitian Amagai *et al.* (2009) yang memperoleh 0,42 g hyaluronan per liter *vitreous humor* mata ikan tuna mata besar.

Ekstraksi hyaluronan dari *vitreous humor* mata tuna telah dilakukan optimalisasi oleh Amagai *et al.* (2009) dengan cara mengambil

vitreous humor dalam kondisi beku untuk mencegah kontaminasi dari darah, daging, jaringan, dan kontaminasi yang lainnya. Ekstraksi juga menggunakan setilpiridium klorida (CPC) yang bersifat polikation untuk memisahkan mukopolisakarida sebelum menghilangkan lemak dan protein. Mukopolisakarida yang dihasilkan dari presipitasi CPC masih mengandung glikosaminoglikan lainnya yaitu kondroitin sulfat, heparin sulfat, dermatan sulfat, dan lainnya.

Hyaluronan dipisahkan dari mukopolisakarida dengan melarutkan dalam larutan NaCl. Tekanan osmotik yang meningkat pada campuran larutan NaCl dan mukopolisakarida menyebabkan munculnya gaya elektrostatis dan peningkatan kelarutan hyaluronan. Gaya elektrostatis pada larutan menyebabkan rentang dan kuat interaksi serta jarak antar molekul agregasi yang mengikat hyaluronan menjadi renggang sehingga hyaluronan dapat terlarut (Horkay *et al.* 2009). Volume larutan NaCl yang digunakan berpengaruh terhadap rendemen hyaluronan yang dihasilkan (Amagai *et al.* 2009).

Hyaluronan yang terlarut diendapkan dengan menambahkan larutan kalium asetat dalam etanol. Penghilangan protein dilakukan secara enzimatis. Hidrolisis enzimatis dipengaruhi oleh pH, suhu, jumlah dan jenis enzim, rasio sampel dan pelarut serta waktu hidrolisis. Penelitian ini menggunakan pH 4,5 yang diduga ada hyaluronan yang masih terikat dengan protein. Pengoptimalan pH akan meningkatkan jumlah rendemen yang diperoleh, walaupun pada pH tersebut enzim masih dapat bekerja. Enzim papain lebih optimal digunakan pada pH 7,5 (Ürgeová dan Vulganová 2016). Hidrolisat diendapkan dengan larutan asam trikloroasetat (TCA)



(a)



(b)

Figure 3 CPC precipitate vitreous humor of tuna eye (a) and hyaluronan tuna fish eye (b)

Table 3 Infrared spectrum absorption hyaluronan of tuna fish eye

Group	Spectral range (cm ⁻¹)* (Verlag dan Weinheim 2003)	Hyaluronan spectrum(cm ⁻¹)		Reference
		Vitreous humor of tuna fish eye	Others source	
OH <i>stretching</i>	3700-3200	3340	3390 3407	Hafsa <i>et al.</i> (2017) Reddy dan Karunakaran (2013)
C=O <i>asymmetric stretching</i>	1760-1720	1750	1720 1740	Carneiro <i>et al.</i> (2016) Haxaire <i>et al.</i> (2003)
Amida III (CO-NH)	1340-1250	1327	1324 1320	Hafsa <i>et al.</i> (2017) Kim <i>et al.</i> (2008)
C-O <i>symmetric stretching</i>	1300-1100	1273	1159 1220	Schneider <i>et al.</i> (2007) Haxaire <i>et al.</i> (2003)
Amida II (N-H)	1650-1580	1550	1551 1616	Hafsa <i>et al.</i> (2017) Reddy dan Karunakaran (2013)
C-O-C <i>stretching</i>	1165-1145	1150	1150 1165	Hafsa <i>et al.</i> (2017) Haxaire <i>et al.</i> (2003)
Amida I (C=O)	1700-1625	1650	1650 1650	Hafsa <i>et al.</i> (2017) Haxaire <i>et al.</i> (2003)
C-H <i>symmetric stretching</i>	2970-2860	2885	2925 2929	Hafsa <i>et al.</i> (2017) Kanchana <i>et al.</i> (2013)

pada konsentrasi 10% pada kondisi dingin. Konsentrasi TCA 10% dapat mengendapkan protein hingga 97% (Polson *et al.* 2003). Kontaminasi lemak pada hyaluronan dipisahkan dengan aseton. Aseton dapat mengendapkan fosfolipid (Budria dan Gonzales 1989). Kesegaran bahan baku yang digunakan juga memengaruhi rendemen. Bahan baku yang tidak segar diduga hyaluronannya telah terdegradasi oleh enzim hyaluronidase pada *vitreous humor*.

Gugus fungsi

Gugus fungsi hyaluronan mata ikan tuna diperoleh menggunakan Bruker Tensor 37 FT-IR *Spectrometer* (sumber sinar mid-IR 4000-400 cm⁻¹, *beamsplitter* KBr) (Table

3). Spektrum gugus fungsi hyaluronan dari *vitreous humor* mata ikan tuna menunjukkan adanya gugus OH *stretching* pada bilangan gelombang 3340 cm⁻¹, gugus C=O *asymmetric stretching* pada bilangan gelombang 1750 cm⁻¹, gugus amida III (CO-NH) pada bilangan gelombang 1327 cm⁻¹, gugus C-O *symmetric stretching* pada bilangan gelombang 1273 cm⁻¹, gugus amida II (N-H) pada bilangan gelombang 1550 cm⁻¹, gugus C-O-C *stretching* pada bilangan gelombang 1150 cm⁻¹, gugus amida I (C=O) pada bilangan gelombang 1650 cm⁻¹, dan C-H *symmetric stretching* pada bilangan gelombang 2885 cm⁻¹(Figure 4).

Hyaluronan merupakan glikosaminoglikan yang tersusun dari disakarida berulang N-asetil-glukosamin dan asam glukuronat

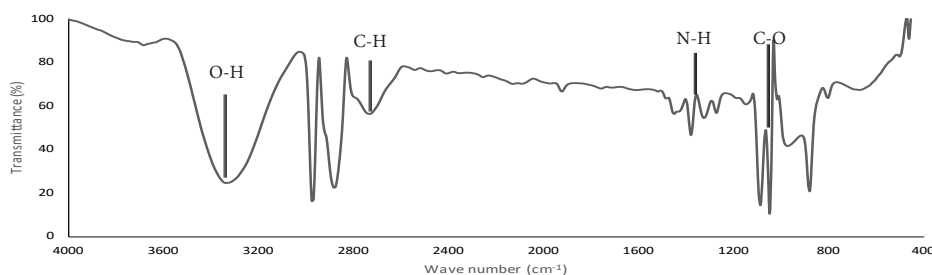


Figure 4 Hyaluronan transmittance spectrum of tuna fish eye vitreous humor.

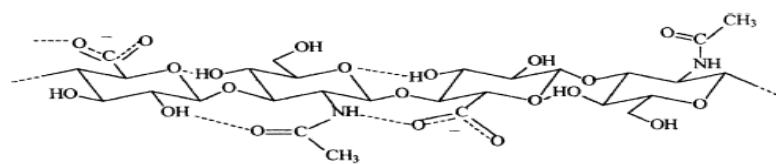


Figure 5 Chemical structure hyaluronan (Garg dan Hales 2004)

(Necas *et al.* 2008) (Figure 5). Gugus fungsi yang menunjukkan hyaluronan yaitu terdeteksinya gugus C-OH, C-O dan C-O-C *stretching*, amida III, simetrik C-O *stretching*, amida II, asimetrik C=O *stretching*, C=O karboksil amida I, C-H *stretching*, dan O-H (Hafsa *et al.* 2017). Gugus fungsi -OH, gugus -NH, -CH₂, COO-, dan C-O-C merupakan gugus hyaluronan (Vasi *et al.* 2014). Reddy dan Karunakaran (2013) menyatakan bahwa standar gugus yang menunjukkan hyaluronan dengan adanya gugus C-O-C *stretching*, gugus C-O dengan kombinasi C≡O, amida II, C-H *stretching*, dan OH *stretching*.

Aktivitas antioksidan hyaluronan

Nilai IC₅₀ hyaluronan dari hasil pengujian dengan radikal DPPH adalah 25,52±0,22 mg/mL. Hasil tersebut lebih tinggi dibandingkan dengan nilai IC₅₀ asam askorbat 6,32±0,24 µg/mL. Kanchana *et al.* (2013) melaporkan bahwa persen inhibisi hyaluronan pada konsentrasi 1 mg/mL mencapai 54,42%, sementara hasil penelitian Hafsa *et al.* (2017) menunjukkan bahwa hyaluronan dari jengger ayam memiliki IC₅₀ 0,36 mg/mL, sedangkan IC₅₀ *Low Molecular Weight Hyaluronan* (LMWA) 0,17 mg/mL. Aktivitas antioksidan uji dikatakan sangat kuat bila IC₅₀ < 50 mg/l, kuat bila IC₅₀ bernilai 50-100 mg/L, sedang bila IC₅₀ bernilai 100-150 mg/L dan lemah bila IC₅₀ bernilai 150-200 mg/L (Blois 2005).

Sampel hyaluronan ketika dilakukan pengujian pada radikal ABTS dengan konsentrasi 2,5 mg/L mengalami penggumpalan sehingga absorbansi yang diperoleh fluktuatif. Penggumpalan tersebut dikarenakan hyaluronan sangat higroskopis dan memiliki viskositas yang tinggi (Sebag 1998). Nilai IC₅₀ asam askorbat dengan radikal ABTS 14,76±1,08 µg/mL. Persen inhibisi hyaluronan pada konsentrasi 0,5 mg/mL yaitu 1,92±0,08%. Persen inhibisi hyaluronan dari moluska menurut Kanchana *et al.* (2013) pada

konsentrasi 0,2 mg/mL mencapai 32,56% dan inhibisi tertinggi dengan ABTS mencapai 71,35% pada konsentrasi 1 mg/mL yang lebih tinggi dibandingkan inhibisi DPPH dan hidroksil.

Pengujian aktivitas antioksidan hyaluronan terhadap ion Fe³⁺ atau metode uji antioksidan yang diketahui dengan *Ferric Reducing Antioxidant Power* (FRAP) yang diukur dari nilai kapasitas reduksi. Senyawa yang bersifat antioksidan dapat mengubah Fe³⁺ menjadi Fe²⁺ yang tidak radikal. Nilai kapasitas reduksi yang diperoleh hyaluronan 9,34±0,55 µM/g sampel kering yang menunjukkan bahwa setiap 1 g hyaluronan dapat mereduksi FeSO₄ 9,34±0,55 µM. Kapasitas reduksi hyaluronan dengan berat molekul rendah lebih tinggi dibandingkan hyaluronan yang memiliki berat molekul tinggi (Choi *et al.* 2010).

Hyaluronan berinteraksi dengan radikal bebas pada C(1) cincin monosakarida, C(3) dari N-asetilglukosamin, atau C(4) dari cincin asam glukuronat (Soltès *et al.* 2006). Campo *et al.* (2004) menyatakan bahwa aktivitas antioksidan pada hyaluronan diduga karena adanya gugus karboksil. Nilai IC₅₀ hyaluronan yang diperoleh lebih tinggi dibandingkan asam askorbat. Nilai IC₅₀ berbanding terbalik dengan nilai aktivitas antioksidan sehingga untuk menghambat 50% radikal bebas hyaluronan yang diperlukan lebih banyak dibandingkan asam askorbat. Rantai utama hyaluronan yang panjang dan viskositas yang tinggi dapat menghambat aktivitas antioksidannya (Li *et al.* 2016). Hyaluronan juga diketahui dapat mengkelat besi (III) melalui gugus N-Glukosamin dan D-asam glukuronat yang berikatan dengan gugus karboksil, hidroksil, dan gugus amida. Hyaluronan dan besi (III) membentuk kompleks yang stabil (Merce *et al.* 2002).

Aktivitas antioksidan suatu senyawa terdiri dari berbagai mekanisme yaitu mencegah inisiasi rantai, mengikat ion metal

transisi pengkatalis, dekomposisi peroksida, kapasitas mereduksi, serta penangkapan radikal (Choi *et al.* 2010). Pengujian aktivitas antioksidan dengan radikal DPPH maupun ABTS yaitu mengukur kemampuan senyawa antioksidan pada sampel dalam melakukan penangkapan terhadap senyawa radikal. Pengujian kapasitas reduksi FRAP mengukur kemampuan senyawa antioksidan pada sampel dalam mereduksi ion ferri menjadi ferro (Prior 2005).

KESIMPULAN

Proporsi *vitreous humor* mata ikan tuna adalah sebesar 31% dari mata, memiliki nilai pH netral, viskositas rendah, kandungan air yang tinggi dan asam amino yang didominasi oleh asam glutamat. Rendemen hyaluronan yang diperoleh dari ekstraksi *vitreous humor* mata ikan tuna $0,005 \pm 0,001\%$. Hyaluronan dari *vitreous humor* mata ikan tuna memiliki aktivitas antioksidan dalam menghambat radikal bebas DPPH dengan nilai IC50 $25,52 \pm 0,22$ mg/mL, dari pengujian ABTS pada konsentrasi 0,5 mg/mL yaitu $1,92 \pm 0,08\%$, sementara dari uji FRAP setiap 1 g hyaluronan dapat mereduksi FeSO_4 $9,34 \pm 0,55$ μM . Ketiga hasil pengujian mengindikasikan hyaluronan memiliki aktivitas antioksidan yang masih lemah.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih penulis sampaikan kepada PT Indofood Sukses Makmur, Tbk melalui program Indofood Riset Nugraha tahun 2017/2018 yang telah mendanai penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Amagai I, Tashiro Y, Ogawa H. 2009. Improvement of the extraction procedure for hyaluronan from fish eyeball and the molecular characterization. *Fisheries Science*. 75(3): 805-810.
- [AOAC] Association of Official Analytical and Chemistry. 1999. Official Methods of Analysis 18th Edition. Maryland (US): AOAC International.
- [ASTM] American Society for Testing Material. 2010. ASTM D789: Standard Test Methods for Determination of Solution Viscosities of Polyamide (PA). Pennsylvania (US) : American Society for Testing Material.
- [ASTM] American Society for Testing Material. 2013. ASTM E1252: Standard Practice for General Techniques for Obtaining Infrared Spectra for Qualitative Analysis. Pennsylvania (US): American Society for Testing Material.
- Benzie IFF, Strain JJ. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 239(1): 70-76.
- Bishop P. 1996. The biochemical structure of mammalian vitreous. *Eye*. 10: 664-670.
- Blois MS. 2005. Antioxidant determination by the use of stable free radical. *Nature*. 181:1191- 1200.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*. 28(1): 25-30.
- [BSN] Badan Standardisasi Nasional. 1992. Cara Uji Makanan dan Minuman Standar Nasional Indonesia : SNI 01-2891-1992. Jakarta (ID): Badan Standardisasi Nasional.
- Budria RJ, Gonzalez EF, Sanz HMT, Ostkiz SJL. 1989. Amniotic fluid phospholipids : study of the cold acetone precipitation effect. *Clinica Chimica Acta*. 180 (2): 141-146.
- Campo GM, Avenoso A, Campo S, D'Ascola A, Ferlazzo AM, Calatroni A. 2004. The antioxidant and antifibrogenic effects of the glycosaminoglycans hyaluronic acid and chondroitin-4-sulphate in a subchronic rat model of carbon tetrachloride-induced liver fibrogenesis. *Chemico-Biological Interactions*. 148(3): 125-138.
- Carneiro, Döll-Boscardin PM, Fiorin BC, Nadal JM, Farago PV, de Paula JP. 2016. Development and characterization of hyaluronic acid-lysine nanoparticles with potential as innovative dermal filling. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 52(4): 645-651.
- Choi J, Kim JK, Kim JH, Kweon DK, Lee JW. 2010. Degradation of hyaluronic acid powder by electron beam irradiation,

- gamma ray irradiation, microwave irradiation and thermal treatment: A comparative study. *Carbohydrate Polymers*. 79: 1080-1085.
- Cowman MK, Lee H G , Schwertfeger KL , McCarthy JB Turley EA. 2015. The content and size of hyaluronan in biological fluids and tissues. *Frontiers in Immunology*. 6:261. 1-8.
- Donati S, Caprani SM, Airaghi G, Vinciguerra R, Bartalena L, Testa F, Mariotti C, Porta G, Simonelli F, Azzolini C. 2014. Vitreous substitutes: the present and the future. *BioMed Research International*. 2014: 1-12.
- Duke-elder WS. 1929. The Physico-chemical properties of the vitreous body. *The Journal of Physiology*. 68 (2): 155-165.
- Falco F, Barra M, Cammarata M, Cuttitta A, Jia S, Bonanno A, Mazzola S, Wu G. 2016. Amino acid composition in eyes from zebrafish (*Danio rerio*) and sardine (*Sardina pilchardus*) at the larval stage. *SpringerPlus*. 26:5:519.
- Fatt I, Weissman BA. 1992. *Physiology of The Eye : An Introduction to The Vegetative Functions*. Los Angeles (US) : Reed Publishing Inc.
- Farmer JG, Benomran F, Watson AA, Harland WA. 1985. Magnesium, potassium, sodium and calcium in post-mortem vitreous humour from humans. *Forensic Science International*. 27(1): 1-13.
- Flemming CR. 1989. Trace element metabolism in adult patients requiring total parenteral nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 49 (3): 573-579.
- Gamarro EG, Orawattanamatekul W, Sentina J, dan Gopal TKS. 2013. *By products of tuna processing*. Rome (IT): Globefish Research Programme.
- Garg HG, Hales CA. 2004. *Chemistry and biology of hyaluronan*. London (UK) : Elsevier.
- [Globefish.org] Global Fish Economy. 2017. Global market trends for raw and processed tuna remained uncertain throughout 2016 (diakses pada 20 April). <http://www.fao.org/in-action/globefish/market-reports/resource-detail/en/c/882595/>.
- Hafsa J, Chaouch MA, Charfeddine B, Rihouey C, Limem K, Cerf DL, Rouatbi S, Majdoub H. 2017. Effect of ultrasonic degradation of hyaluronic acid extracted from rooster comb on antioxidant and antiglycation activities. *Pharmaceutical Biology*. 55 (1): 156-163.
- Haxaire K, Maréchal Y, Milas M, Rinaudo M. 2003. Hydration of polysaccharide hyaluronan observed by IR spectrometry. I. Preliminary experiments and band assignments. *Biopolymers*. 72 (1): 10-20.
- Horkay F, Basser PJ, Londono DJ, Hech AM, Geissler E. 2009. Ions in hyaluronic acid solutions. *The Journal of Chemical Physics*. 131 (18): 1-8.
- Kanchana K, Arumugam M, Giji S, Balasubramanian T. 2013. Isolation, characterization and antioxidant activity of hyaluronic acid from marine bivalve mollusc *Amusium pleuronectus* (Linnaeus, 1758). *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*. 2 (1): 1 - 7.
- Khoddami A, Ariffin AA, Bakar J, Ghazali HM. 2012. Quality and fatty acid profile of the oil extracted from fish waste (head, intestine and liver) (*Euthynnus affinis*). *African Journal of Biotechnology*. 11(7): 1683-1689.
- [KKP] Kementerian Kelautan dan Perikanan. 2018. Pesona tuna sebagai penggerak bisnis perikanan Indonesia. (diakses pada 28 September 2018) <http://kkp.go.id/artikel/4409-pesona-tuna-sebagai-penggerak-bisnis-perikanan-Indonesia>.
- Kim JK, Srinivasan P, Kim JH, Choi J, Park HJ, Byun MW, Lee JW. 2008. Structural and antioxidant properties of gamma irradiated hyaluronic acid. *Food Chemistry*. 109 (4): 763-770.
- Lapcik L, Omelka L, Kubena K, Galatik A, Kello V. 1990. Photodegradation of hyaluronic acid and of the vitreous body. *General Physiology and Biophysics*. 9 (4): 419-429.
- Lapuerta P, Schein SJ. 1995. A four-surface schematic eye of macaque monkey obtained by an optical method. *Vision*

- Research*. 35 (16): 2245-2254.
- Li S, Xiong Q, Lai X, Li X, Wan M, Zhang J, Yan Y, Cao M, Lu L, Guan J, Zhang D, Lin Y. 2016. Molecular modification of polysaccharides and resulting bioactivities. *Comprehensive Reviews Food Science and Food Safety*. 15: 237–250.
- Lorget F, Parenteau A, Carrier M, Lambert D, Gueorguieva A, Schuetz C, Bantsev V, Thackaberry E. 2015. Characterization of the pH and temperature in the rabbit, pig, and monkey eye: key parameters for the development of long-acting delivery ocular strategies. *Molecular Pharmaceutics*. 13 (9):1-6.
- Meyer K, Palmer JW. 1934. The polysaccharide of the vitreous humor. *Journal Biology Chemistry*. 107: 629-634.
- Merce ALR, Carrera LCM, Romanholi LKS, Recio MAL. 2002. Aqueous and solid complexes of iron(III) with hyaluronic acid : Potentiometric titrations and infrared spectroscopy studies. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 89 (3-4): 212-218.
- Morgano MA, Rabonato LC, Milani RF, Miyagasku L, Balian SC. 2011. Assessment of trace elements in fishes of Japanese foodmarketed in Saõ Paulo (Brazil). *Food Control*. 22: 778–785.
- Morris ER, Rees DA, Welsh EJ. 1980. Conformation and dynamic interactions in hyaluronate solutions. *Journal Molecular Biology*. 138 (2): 383–400.
- Moseley R, Walker M, Waddington RJ, Chen WYJ. 2003. Comparison of the antioxidant properties of wound dressing materials–carboxymethylcellulose, hyaluronan benzyl ester and hyaluronan, towards polymorphonuclear leukocyte-derived reactive oxygen species. *Biomaterials*. 24 (9): 1549-1557.
- Murado MA, Montemayor MI, Cabo ML, Vasquez JA, Gonzalez MP. 2012. Optimization of extraction and purification process of hyaluronic acid from fish eyeball. *Food and Bioproducts Processing*. 90 (3): 491-498.
- Mutamimah D, Ibrahim B, Trilaksana W. 2018. Antioxidant activity of protein hydrolysate produced from tuna eye (*Thunnus sp.*) by enzymatic hydrolysis. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 21(3): 522-531.
- Mutti D, Zadnik K, Murphy CJ. 1999. Naturally occurring vitreous chamber—based myopia in the labrador retriever. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 40(7):1577-84.
- Necas J, Bartosikova L, Brauner P, Kolar J. 2008. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinarni Medicina*. 53 (8): 397-411.
- Nollet LML. 1996. *Handbook of Food Analysis Amino Acid*. New York (US): Marcel DekkerInc.
- Peng S, Chen C, Shi Z, Wang L. 2013. Amino acid and fatty acid composition of the muscle tissue of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) and bigeye tuna (*Thunnus obesus*). *Journal of Food and Nutrition Research*. 1(4): 42-45.
- Prasertsan P, Prachumratana T. 2008. Comparison and selection of protease and lipase sources from visceral organs of three tuna species. *Songklanakarın Journal of Science and Technology*. 30(1) : 73-76.
- Prior RL, Wu X, Schaich K. 2005. Standardized methods for determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 53(10): 4290-4302.
- Polson C, Sarkar P, Incedon B, Raguvaran V, Grant R. 2003. Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 785 (2) : 263-275.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Evans CR. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 26 (9-10): 1231-1237.
- Reddy KJ, Karunakaran KT. 2013. Purification and characterization of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus* strain 3523-7. *Journal of Bioscience and Biotechnology*. 2(3): 173-179.
- Renuka V, Anandan R, Suseela M, Ravishankar

- CN, Sivaraman GK. 2016. Fatty acid profile of yellowfin tuna eye (*Thunnus albacares*) and oil sardine muscle (*Sardinella longiceps*). *Fishery Technology*. 53: 151 – 154.
- Rinjani. 2017. Potensi pemanfaatan limbah industri perikanan tuna. [Skripsi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Schneider A, Picart C, Senger B, Schaaf P, Voegel JC, Frisch B. 2007. Layer-by-layer films from hyaluronan and amine modified hyaluronan. *National Institutes of Health Public Access*. 23(5): 2655-2662.
- Scott JE. 1992. The chemical morphology of the vitreous. *Eye*. 6 : 553-555.
- Sebag J. 1989. *The Vitreous : Structure, Function, and Pathobiology*. California (US) : Springer-Verlag New York Inc.
- Sebag J. 1998. Macromolecular structure of corpus vitreus. *Progress in Polymer Science*. 23 (3): 415 - 446.
- Soltês L, Mendhici R, Kogan G, Schiller J, Stankovska M, Arnhold J. 2006. Degradative action of reactive oxygen species on hyaluronan. *Biomacromolecules*. 7(3): 659-668.
- Soman N, Banerjee R. 2003. Artificial vitreous replacements. *Biomedical Materials and Engineering*. 13 (1): 59-74.
- Suri S, Banerjee R. 2006. Biophysical evaluation of vitreous humor, its constituents and substitutes. *Trends Biomaterial Artificial Organs*. 20(1): 72-77.
- Toppe J. 2017. *Fish for food security – more than just fillets*. INFOFISH International. 4: 18-20.
- Ūrgeová E, Vulganová K. 2016. Comparison of enzymatic hydrolysis of polysaccharides from eggshells membranes. *Nova Biotechnologica et Chimica*. 15 (2): 133-140.
- Vasi AM, Popa MI, Butnaru M, Dodi G, Verestiuc L. 2014. Chemical functionalization of hyaluronic acid for drug delivery applications. *Materials Science and Engineering C*. 38: 177-185.
- Verlag GmbH, Weinheim. 2003. *Handbook of Spectroscopy*. Jerman (DE): Wiley-VCH.
- Volpi N, Maccari F. 2003. Purification and characterization of hyaluronic acid from the mollusc bivalve *Mytilus galloprovincialis*. *Biochimie*. 85 (6): 619–625.
- Young RG, Williams HH. 1954. Biochemistry of the eye : gelatinous protein of vitreous body. *Archives of Ophthalmol*. 51(5):593-595.