



EKSTRAKSI DAN KARAKTERISASI ENZIM TRIP SIN DARI JEROAN IKAN BANDENG (*Chanos chanos*) HASIL PURIFIKASI PARSIAL

Rosella Silaban, Tati Nurhayati*, Asadatun Abdullah

Departemen Teknologi Hasil Perairan, IPB University
Jalan Agatis, Kampus IPB Dramaga 16680 Bogor

Diterima: 24 November 2024/Disetujui: 17 Januari 2025

*Korespondensi: tnurhayati@apps.ipb.ac.id

Cara sitasi (APA Style 7th): Silaban, R., Nurhayati, T., & Abdullah, A. (2025). Ekstraksi dan karakterisasi enzim tripsin dari jeroan ikan bandeng (*Chanos chanos*) hasil purifikasi parsial. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 28(1), 24-37. <http://dx.doi.org/10.17844/jphpi.v28i1.60565>

Abstrak

Jeroan ikan memiliki enzim pencernaan yang tinggi, terutama proteinase misalnya tripsin. Karakteristik tripsin ikan dipengaruhi oleh jenis ikan dan habitatnya. Jeroan ikan bandeng merupakan bagian dari saluran pencernaan ikan dan memiliki pH netral sehingga berpotensi menjadi sumber enzim khususnya tripsin. Jeroan ikan dapat menjadi alternatif pengganti enzim tripsin komersial yang berasal dari daging babi dan sapi. Tujuan penelitian ini adalah menentukan karakteristik enzim tripsin dari fraksi amonium sulfat yang diekstraksi dari jeroan bandeng. Proses penelitian diawali dengan ekstraksi enzim tripsin dari jeroan ikan bandeng, dilanjutkan dengan fraksinasi dengan amonium sulfat (0-80%). Karakterisasi tripsin fraksi terbaik meliputi suhu, pH, pengaruh ion logam, pengaruh NaCl terhadap aktivitas enzim, dan kinetika reaksi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak kasar tripsin memiliki aktivitas sebesar 0,117 U/mL. Aktivitas enzim tripsin tertinggi pada fraksi amonium sulfat 20-30%, yaitu sebesar 0,295 U/mL. Enzim bekerja paling baik pada suhu 50°C dan pH 6. Aktivitas enzim tripsin dihambat dengan adanya ion NaCl, MnCl₂, ZnCl₂, CuCl₂, dan CaCl₂ mengalami penghambatan pada setiap jenis ion logam yang berbeda dan bersifat sebagai inhibitor. Aktivitas tripsin pada NaCl 5-30% meningkat pada rasio 10%, yaitu sebesar 0,249 U/mL. Nilai V_{max} enzim ini adalah 0,285 mmol/s, dan nilai K_m -nya adalah 0,374 mM.

Kata kunci: aktivitas enzim, amonium sulfat, kinetika reaksi, SDS-PAGE, stabilitas NaCl

Extraction and Characterization of Tripsin Enzyme from Milkfish (*Chanos chanos*) Partial Purification Result

Abstract

Fish offal is known for its high content of digestive enzymes, especially proteinases such as trypsin. The characteristics of fish trypsin are influenced by the species and habitat. Milkfish offal is part of the fish digestive tract and has a neutral pH, so it is a potential source of enzymes, especially trypsin. Fish offal can be an alternative to commercial trypsin enzymes derived from pork and beef. The purpose of this study was to determine the characteristics of trypsin enzyme from milkfish offal with ammonium sulfate fraction. The research process began with the extraction of trypsin enzyme from milkfish offal, followed by fractionation with ammonium sulfate (0-80%). Characterization of the best trypsin fraction includes temperature, pH, the effect of metal ions, the effect of NaCl on enzyme activity, and reaction kinetics were all used to determine the best fraction. The results showed that the crude trypsin extract had an activity of 0.117 U/mL. The highest trypsin enzyme activity was in the 20-30% ammonium sulfate fraction, which was 0.295 U/mL. The enzyme worked best at a temperature of 50°C and pH 6. The metal ions ZnCl₂, MnCl₂, CuCl₂, NaCl, and CaCl₂ inhibited the trypsin enzyme activity. Trypsin activity in 5-30% NaCl increased to a ratio of 10%, which was 0.249 U/mL. The V_{max} value of this enzyme was 0.285 mmol/s, and the K_m value was 0.374 mM.

Keywords: ammonium sulfate, enzyme activity, NaCl stability, reaction kinetics, SDS-PAGE

PENDAHULUAN

Enzim merupakan salah satu produk industri yang bernilai ekonomis cukup tinggi di pasar dunia. Permintaan industri terkait kebutuhan enzim saat ini di Indonesia makin meningkat setiap tahunnya bersamaan dengan permintaan pasar global. Pasar enzim global bernilai USD 11,47 miliar pada tahun 2021 dan akan terus meningkat berdasarkan *compound annual growth rate* (CAGR) sebesar 6,5% dari tahun 2022-2030 (GVR, 2020). Hal ini sejalan dengan berkembangnya industri pangan dan nonpangan yang memanfaatkan enzim sebagai katalisator dalam berbagai reaksi kimia. Indonesia sendiri mengimpor hampir seluruh kebutuhan enzim (sekitar 90%) dari luar negeri (Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi [BPPT], 2014). Enzim tersebut diimpor dari negara lain, misalnya China, Thailand, dan Finlandia yang mencapai angka 5.707 ton (CCI 2017). Kebutuhan enzim di Indonesia diperkirakan mencapai 2.500 ton dengan nilai impor sekitar 200 miliar rupiah pada tahun 2017 dengan laju pertumbuhan volume rata-rata 5-7% per tahun (RISTEKDIKTI, 2017).

Penggunaan enzim memungkinkan hasil produk yang lebih baik. Enzim banyak digunakan dalam proses kimiawi pada bidang farmasi, industri dan bioteknologi. Contoh penggunaan enzim, yaitu pada pengolahan makanan diaplikasikan dalam pengolahan protein atau peptida contohnya pada pembuatan hidrolisat protein serta pada industri surimi, mengurangi alergenitas dan meningkatkan pencernaan makanan bayi (Ketnawa *et al.*, 2017; Mao *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2020). Tripsin pada bidang farmasi dimanfaatkan dalam pembuatan insulin untuk mengubah prekursor insulin menjadi ester insulin (Liu *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2014). Peningkatan permintaan terhadap enzim terus meningkat seperti pada industri. Kebutuhan enzim tersebut dapat diatasi dengan pendirian pabrik enzim bernama PT Petrosida Gresik. Perusahaan tersebut telah diresmikan oleh Kementerian Pendidikan, Kebudayaan, Riset, dan Teknologi dengan memproduksi enzim protease dan xilanase yang dapat memenuhi sekitar 10% kebutuhan enzim industri di Indonesia.

Tripsin merupakan enzim yang penting khususnya sebagai katalisator dalam pembuatan vaksin. Tripsin digunakan untuk mengatalisis atau menstimulasi proses pertumbuhan mikroba untuk bahan aktif vaksinnya. Selain menjadi katalisator, tripsin juga memiliki peranan lain dalam produksi vaksin di antaranya mencegah pelekatan sel-sel bakteri atau virus pada tempat penumbuhan selama proses pengkulturan (RISTEKSDIKTI, 2017). Tripsin yang digunakan pada industri vaksin sumber utamanya, yaitu tripsin dari babi dan sapi.

Tripsin komersial saat ini umumnya diperoleh dari ekstraksi protease menggunakan asam atau alkohol dari pankreas mamalia, umumnya babi (Parfitt, 1999). Penggunaan pankreas babi sebagai bahan baku dalam pembuatan enzim merupakan hal yang kontroversial di masyarakat Indonesia yang mayoritasnya muslim karena masalah kehalalannya (Muallifah, 2017). Sapi dapat dijadikan sebagai alternatif sumber tripsin. Namun, tripsin dari sapi belum umum penggunaannya serta dikhawatirkan terjangkit penyakit *bovine spongiform encephalopathy* (BSE) yang populer sebagai penyakit sapi gila sehingga penggunaan tripsin dari sapi masih dihindari (Ranasasmita & Roswiem, 2015). Terkait kehalalan dan kesehatan menjadi faktor yang mendorong perlunya substitusi bahan baku utama lain, yaitu jeroan ikan. Penelitian terkait tripsin telah banyak dilakukan, yaitu oleh Khandagale *et al.* (2017) jeroan ikan *Sardinella longiceps* memiliki aktivitas tripsin 23,5 U/mL. Jeroan ikan *boops boops* juga memiliki aktivitas tripsin 23 U/mL (Barkia *et al.*, 2010). Kim & Jeong (2015) melaporkan bahwa jeroan bagian usus ikan *Paralichthys olivaceus* juga memiliki aktivitas enzim tripsin. Isolasi tripsin dari berbagai jenis ikan telah dilakukan, yaitu dari *goatfish* berbintik (*Pseudupeneus maculatus*) (Klomklao *et al.*, 2006), kakap merah cokelat *stripe* (*Lutjanus vitta*) (Khantaphant & Benjakul, 2010), sarden (*Sardinella aurita*) (Khaled *et al.*, 2011), perak mojarra (*Diapterus rhombeus*) (Silva *et al.*, 2011), dan *zebra blenny* (*Salaria basilisca*) (Ktari *et al.*, 2012). Nuhayati *et al.* (2021) berhasil mendapatkan komponen asam amino



dan aktivitas enzim tripsin dari usus tuna sirip kuning dan kakap merah.

Isolasi enzim tripsin dari jeroan ikan bandeng belum dilaporkan, padahal produksi ikan bandeng sangat tinggi. Kementerian Kelautan dan Perikanan (KKP) mencatat, produksi ikan bandeng di Indonesia sebesar 785.719 ton dengan nilai Rp.16,53 triliun pada tahun 2022. Produksi perikanan bandeng diikuti dengan tingginya limbah yang dihasilkan. Ikan bandeng memiliki daging 48,62%, jeroan 4,39%, dan hasil sampingan 46,99%. Saat ini ikan bandeng yang dibudidayakan biasa dijual dalam keadaan sudah digoreng, dibakar, dikukus, dipindang, dipresto, diasap, ataupun dalam keadaan segar dan jeroannya dibuang. Jumlah limbah ini belum dimanfaatkan dan berpotensi mencemari lingkungan.

Hal ini perlu diimbangi dengan penanganan dan pemanfaatan limbah. Limbah jeroan ikan diketahui memiliki potensi sebagai bahan baku alternatif enzim tripsin. Pengendapan dengan amonium sulfat diprediksi mampu meningkatkan aktivitas dengan cara mengurangi kandungan senyawa-senyawa lain dari ekstrak kasar enzim. Penelitian ini bertujuan menentukan karakteristik tripsin fraksi amonium sulfat yang diekstraksi dari jeroan ikan.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilakukan melalui dua tahapan. Tahapan pertama, yaitu ekstraksi dan pengendapan ekstrak kasar enzim dengan amonium sulfat. Tahapan kedua, yaitu karakterisasi enzim tripsin fraksi terbaik.

Ekstraksi Enzim Tripsin

Jeroan ikan bandeng (*Chanos chanos*) berasal dari PT Cindy Group Indonesia. Ekstraksi enzim tripsin dari jeroan ikan bandeng mengacu pada Barkia *et al.* (2010). Jeroan ikan dihaluskan dan dihomogenkan dengan buffer Tris-HCl 0,01 M pH 8 pada rasio 1:4 (b/v). Sampel kemudian disentrifugasi selama 20 menit pada suhu 4°C pada kecepatan 8.000 ×g. Supernatan yang dihasilkan adalah ekstrak enzim kasar. Ekstrak kasar enzim tripsin (supernatan) diuji kandungan protein dan aktivitas enzimnya.

Pengendapan Ekstrak Kasar Enzim Tripsin dengan Amonium Sulfat (Barkia *et al.*, 2010)

Metode pengendapan ekstrak kasar enzim tripsin dengan amonium sulfat mengacu pada Barkia *et al.* (2010). Supernatan yang dihasilkan di tahap ekstraksi diendapkan dengan amonium sulfat terfraksinasi. Fraksi amonium sulfat yang digunakan meliputi 0-10%, 10-20%, 20-30%, 30-40%, 40-50%, 50-60%, 60-70%, dan 70-80% (b/v). Sampel ditempatkan dalam tabung reaksi, dan suhu labu dikondisikan hingga 4°C menggunakan es gel. Larutan amonium sulfat ditambahkan ke larutan enzim secara bertahap sambil diaduk. Proses pencampuran membutuhkan waktu ±45 menit. Larutan enzim disentrifugasi pada 8.000 ×g selama 20 menit pada suhu 4°C. Endapan dipisahkan dari cairan. Volume cairan yang tersisa diukur untuk digunakan dalam pengendapan fraksi berikutnya. Endapan yang terbentuk pada tahap ini diuji kandungan protein dan aktivitas enzimnya. Hasil pengendapan ekstrak kasar enzim tripsin dengan amonium sulfat terbaik selanjutnya dikarakterisasi.

Analisis Kadar Protein (Bradford, 1976)

Analisis kadar protein berdasarkan Bradford (1976). Analisis konsentrasi protein dimulai dengan pembuatan pereaksi Bradford, yang diawali dengan melarutkan 5 mL etanol 95% dalam 10 mg *coomasie brilliant blue*, penambahan asam fosfat 85% sebanyak 10 mL (b/v) dan akuades 250 mL ditambahkan ke dalam campuran. Campuran tersebut kemudian disaring melalui kertas saring Whatman nomor 1 untuk menghasilkan pereaksi Bradford. Pereaksi Bradford 5 mL dicampur dengan 0,1 mL larutan sampel dalam tabung reaksi. Campuran tersebut kemudian diinkubasi selama 5 menit dan diukur secara spektrofotometri pada 595 nm.

Larutan stok merupakan pelarutan *bovine serum albumin* (BSA) pada konsentrasi 2 mg/mL. Rentang standar konsentrasi yang digunakan pada larutan stok, yaitu 0,1-1,0 mg/mL. Larutan stok diencerkan menggunakan akuades hingga mendapatkan konsentrasi yang dibutuhkan. Larutan stok dari rentang

konsentrasi standar kemudian dipipet 0,1 mL dan ditambahkan dengan larutan Bradford 5 mL. Larutan standar diukur menggunakan spektrofotometri dengan panjang gelombang 595 nm untuk melihat nilai absorbansinya.

Analisis Aktivitas Enzim

Analisis aktivitas enzim dilakukan berdasarkan modifikasi Silva *et al.* (2011). Analisis diawali dengan penggunaan BAPNA sebagai substrat spesifik enzim tripsin. Larutan BAPNA dibuat dengan melarutkan 0,0435 g BAPNA dalam 1 mL DMSO kemudian diencerkan dengan 0,05 M Tris HCl yang mengandung 0,02 M $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ hingga 100 mL. Campuran BAPNA sebanyak 2,5 mL ditambahkan ke dalam 0,05 mL sampel dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 60°C. Setelah menambahkan 1 mL larutan asetat 30%, campuran sampel diinkubasi pada suhu 60°C selama 10 menit lagi. Absorbansi sampel diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 410 nm. Aktivitas enzim tripsin dapat diperkirakan menggunakan persamaan berikut:

$$U = \frac{(A-B) \times C \times 1.000}{8.800 \times D \times E}$$

Keterangan:

U = aktivitas enzim

A = A_{sampel}

B = A_{blanko}

C = volume total setelah direaksikan

D = waktu inkubasi

E = volume enzim yang direaksikan

Analisis Bobot Molekul (SDS-PAGE)

SDS-PAGE digunakan untuk menentukan berat molekul tripsin cair. Analisis ini berdasarkan metode Laemmli (1970). Langkah pertama, yaitu mencampurkan 15 μL bahan dengan 15 μL bufer yang mengandung 0,125 M tris-HCl, pH 6,8, 4% SDS, 20% gliserol, dan 10% β mercaptoethanol (β ME). Campuran tersebut diaduk, disentrifugasi selama 1 menit, dan disimpan pada suhu 0°C. Langkah selanjutnya adalah menyiapkan *gel stoking* pada konsentrasi 4% dan *separating gel* pada 15%. Sampel kemudian ditempatkan ke dalam sumur dan dibiarkan mengalir.

Tahap sampel berjalan dilakukan selama 4 jam atau sampai pita pada marker mencapai batas bawah gel, menggunakan arus 13 mA/gel dan tegangan 100 V, lalu diwarnai. Tahap pewarnaan dilakukan menggunakan 0,1% *Coomasia Brilliant Blue R-250* dalam 7% asam asetat dan 50% metanol, lalu dibilas menggunakan 7% asam asetat hingga pita-pita terlihat.

Karakterisasi Enzim Tripsin Fraksi Amonium Sulfat Terbaik

Karakterisasi enzim tripsin yang dilakukan meliputi penentuan suhu dan pH optimum, pengaruh ion logam, dan pengaruh konsentrasi NaCl terhadap aktivitas enzim tersebut, serta penentuan kinetika reaksi. Suhu optimum enzim tripsin ditentukan dengan melakukan variasi suhu inkubasi (30-70°C). Penentuan pH optimum dilakukan dengan menambahkan buffer TrisCl 0,05M pH 5-10. Logam yang digunakan untuk menentukan pengaruhnya terhadap aktivitas enzim tripsin, yaitu NaCl, MnCl_2 , ZnCl_2 , CuCl_2 , dan CaCl_2 . Konsentrasi NaCl yang digunakan untuk mengetahui stabilitas enzim tripsin adalah 5, 10, 15, 20, 25, dan 30% (b/v). Penentuan suhu, pH optimum, dan pengaruh NaCl terhadap aktivitas enzim berdasarkan Nurhayati *et al.* (2020). Konsentrasi substrat yang digunakan untuk menentukan kinetika reaksi adalah 1-3,0% (b/v). Penentuan kinetika reaksi enzim berdasarkan Lehninger (1997).

Analisis Data

Data kuantitatif hasil penelitian diolah menggunakan aplikasi Microsoft Excel 2010 dengan menghitung nilai tengah dan standar deviasinya. Data disajikan dalam bentuk tabel dan dijelaskan secara deskriptif. Penelitian dilakukan dengan tiga kali pengulangan pada setiap parameter uji.

HASIL DAN PEMBAHASAN Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim Tripsin

Aktivitas enzim ditentukan dengan mengukur nilai absorbansi dari sampel yang telah direaksikan menggunakan substrat spesifik. Aktivitas enzim tripsin dilakukan menggunakan substrat *N- α -benzoyl-DL-*



arginine-p-nitroanilide (BAPNA) yang dilarutkan dalam tris-HCl pH 8 dan diinkubasi pada suhu 60°C. Penggunaan pelarut buffer Tris-HCl dapat menjaga kestabilan pH selama proses ekstraksi. Penggunaan pH 8 karena enzim tripsin menurut penjelasan Benjakul *et al.* (1997) merupakan enzim yang termasuk protease alkali. Uji aktivitas enzim dilakukan untuk mengetahui ada tidaknya aktivitas enzim tripsin dalam ekstrak kasar. Nilai absorbansi terlihat pada saat pengukuran spektrofotometri. Kadar protein diukur menggunakan metode Bradford yang kemudian diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 595 nm.

Ekstrak kasar tripsin jeroan ikan bandeng memiliki aktivitas 0,117 U/mL dan konsentrasi protein 13,297 mg/mL. Aktivitas enzim tripsin fraksi amonium sulfat 20-30%, yaitu 0,292 U/mL dan kadar protein 3,309 mg/mL. Ekstrak enzim tripsin yang dianalisis menghidrolisis BAPNA secara efisien. Hasil ini sedikit lebih tinggi dari penelitian Nurhayati *et al.* (2021) diperoleh nilai ekstrak kasar tripsin yang berasal dari usus ikan tuna sirip kuning sebesar 0,050 U/mL dan kadar protein 0,195 mg/mL. Tripsin yang diteliti oleh Nurhayati *et al.* (2020) menggunakan usus ikan tongkol diperoleh aktivitas ekstrak kasar tripsin sebesar 0,205 U/mL dan kadar protein 0,700 mg/mL. Suhito (2016)

menyatakan kerja enzim dapat dipengaruhi oleh suhu, pH, konsentrasi substrat, aktivator (pengaktif), inhibitor (penghambat) dan faktor lain umur ikan, wilayah perairan ikan, serta asupan makanan yang dikonsumsi oleh ikan tersebut. Faktor-faktor tersebut berkaitan dengan habitat dan genetik pada spesies ikan (Silva *et al.*, 2011).

Tripsin dari Jeroan Ikan Bandeng setelah Pengendapan dengan Amonium Sulfat

Ekstrak kasar enzim tripsin diendapkan menggunakan amonium sulfat. Pelet yang dihasilkan diuji aktivitas enzim dan kadar protein. Hasil pengujian aktivitas enzim dapat dilihat pada *Figure 1*.

Aktivitas enzim tripsin tertinggi terdapat pada fraksi 20-30% sebesar 0,295 U/mL. Aktivitas ini meningkat 17,8% dibandingkan dengan aktivitas ekstrak kasar enzim. Fraksinasi dengan amonium sulfat merupakan salah satu cara pemurnian protein melalui proses pengendapan garam. Penambahan garam amonium sulfat akan menurunkan kelarutan protein karena terjadinya kompetisi antara ion garam yang ditambahkan dengan protein yang terlarut sehingga terjadi efek salting out (Fatoni *et al.*, 2008). Protein yang mengalami proses pengendapan akan terpisah dari monosakarida, oligosakarida, nukleotida, dan

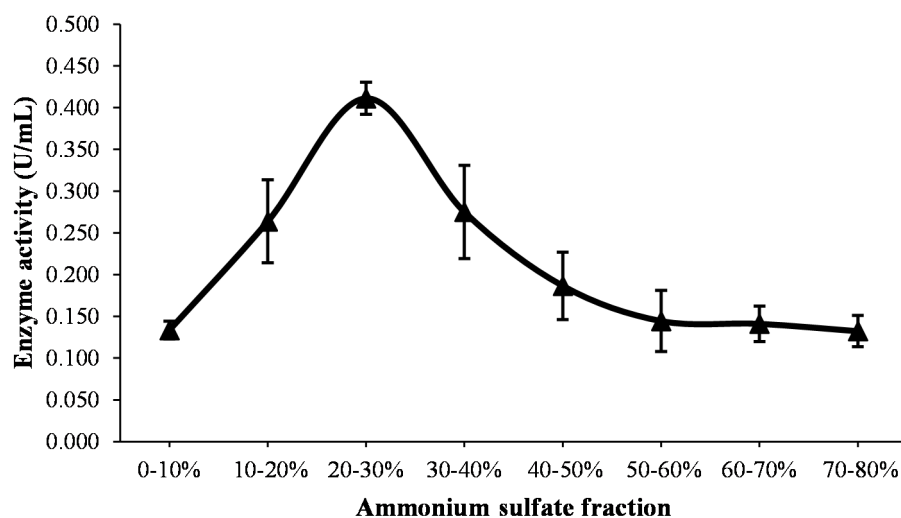


Figure 1 Activity of trypsin after precipitation with ammonium sulfate (0-80%)
Gambar 1 Aktivitas tripsin setelah pengendapan dengan amonium sulfat (0-80%)

asam amino bebas, sedangkan protein target tetap berada di dalam larutan (Budiman, 2011).

Khandagale *et al.* (2017) dengan sampel *Sardinella longiceps* mendapatkan hasil pemurnian 1,7 kali dengan pengendapan 30-70% amonium sulfat. Aktivitas tripsin fraksi amonium sulfat yang diisolasi dari jeroan ikan bogou (*boops boops*) memiliki aktivitas sebesar 0,6 U/mL. Pengendapan dengan amonium sulfat bertujuan untuk meningkatkan aktivitas dengan cara mengurangi kandungan senyawa-senyawa lain dari ekstrak kasar enzim. Kelebihan metode ini, yaitu sederhana, murah, dan tidak akan merusak enzim.

Pengendapan dengan amonium sulfat akan memengaruhi kelarutan protein. Garam yang banyak digunakan dalam mengendapkan protein salah satunya adalah amonium sulfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). Amonium sulfat sering digunakan pada proses karena tingkat kelarutannya yang tinggi sehingga membuat larutan memiliki kekuatan ionik yang tinggi, hal itu diperkuat dengan pernyataan bahwa NH_4^+ dan SO_4^{2-} menunjukkan stabilitas yang tinggi terhadap pengikatan struktur protein. *Salting out* terjadi akibat kompetisi antara ion-ion dari garam amonium dan molekul enzim dalam berinteraksi dengan molekul air (Burgess, 2009). Tingginya kadar ion menyebabkan molekul protein berinteraksi dengan molekul protein lainnya sehingga membentuk endapan. Pengendapan ini tidak akan menyebabkan struktur protein dari enzim rusak dan kehilangan aktivitasnya apabila dilakukan pada suhu 5-10°C (Sinaga *et al.*, 2014).

Suhu Optimum Tripsin Jeroan Ikan Bandeng Fraksi Terbaik

Suhu memengaruhi aktivitas tripsin. Aktivitas enzim meningkat seiring dengan meningkatnya suhu yang digunakan dan mencapai maksimum pada suhu 50°C sebesar 0,619 U/mL. Hasil tersebut sejalan dengan penelitian Nurhayati *et al.* (2024) suhu optimum enzim tripsin usus ikan sebelah, baronang, dan cucut pada suhu 50°C. Suhartono (1989) melaporkan bahwa suhu yang meningkat sampai suhu optimum menyebabkan kecepatan reaksi enzim naik

karena energinya bertambah. Energi yang meningkat akan mempercepat gerak vibrasi, translasi, rotasi enzim dan substrat sehingga memperbesar peluang enzim dan substrat bereaksi. Selain itu, suhu yang meningkat dapat meningkatkan frekuensi tumbukan antara molekul enzim dan substrat sehingga mengaktifkan enzim (Yazid, 2006).

Aktivitas enzim tidak dapat dipertahankan lagi pada suhu 60°C akibatnya terjadi penurunan aktivitas enzim. Kehilangan aktivitas enzim selama pemanasan disebabkan terjadinya denaturasi enzim (Wang *et al.*, 2010). Fitriani (2003) menyatakan bahwa meningkatnya suhu melebihi suhu optimum protein yang akan terdenaturasi pada suhu tinggi. Hal tersebut mengakibatkan tidak terbentuknya kompleks enzim dengan substrat sehingga aktivitas enzim menurun. Aktivitas tripsin dengan suhu inkubasi yang berbeda dapat dilihat pada *Figure 2*.

Khandagale *et al.* (2017) yang menggunakan sampel *Sardinella longiceps* melaporkan hasil suhu optimum dengan aktivitas maksimumnya pada suhu 60°C sejalan dengan enzim tripsin ikan tongkol. Namun, suhu optimum enzim tripsin ikan tongkol lebih tinggi dibandingkan hasil penelitian Bougateg *et al.* (2007) yang menggunakan sampel *Sardina pilchardus* dengan aktivitas maksimum pada suhu 55°C, dan penelitian Balti *et al.* (2009) lebih tinggi dengan aktivitas maksimumnya pada suhu 70°C. Perbedaan suhu optimum dapat berhubungan dengan kondisi pada saat pengujian dan substrat yang digunakan (Klomklao *et al.*, 2007).

Lingkungan hidup ikan dapat memengaruhi suhu optimum tripsin (Kim & Jeong, 2012). Oktavianto *et al.* (2009) menyatakan bahwa suhu air dapat memengaruhi proses enzimatik dalam tubuh ikan. Grizelle & Rogers (2003) menyatakan bahwa suhu lingkungan hewan akuatik memengaruhi proses fisiologis dalam tubuh, salah satunya aktivitas enzim. Habitat ikan dibedakan menjadi *tropical zone fish*, *temperate zone fish*, dan *frigid zone fish*. Ikan bandeng termasuk ikan yang mendiami seluruh lautan hangat di dunia (*tropical zone fish*) dan lautan dingin (*frigid zone fish*) (Rohit *et al.*, 2012). Sesuai dengan penelitian

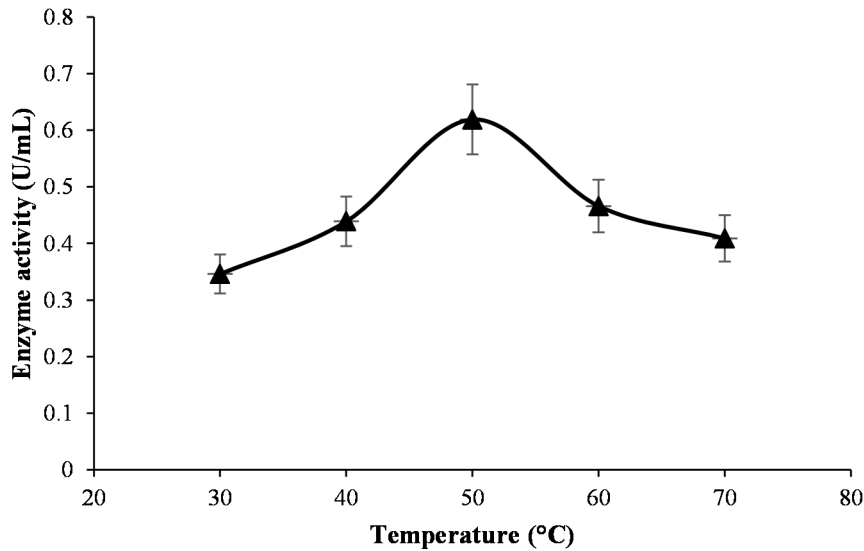


Figure 2 Trypsin activity at different incubation temperatures

Gambar 2 Aktivitas tripsin pada suhu inkubasi yang berbeda

mengenai *frigid zone fish* atau ikan yang hidup di Perairan Antarktika, ikan *walleye pollock* (*Theragra chalcogramma*) memiliki suhu optimal tripsin 50°C. Habitat ikan yang hidup di perairan dingin akan lebih rendah dibandingkan dengan ikan yang hidup pada perairan tropis (Arbajayanti, 2022). Tripsin yang diisolasi dari pankreas hiu kucing (*Scyliorhinus canicular*) memiliki aktivitas optimal tripsin pada suhu 55°C (Blanco *et al.*, 2013). Ikan hiu kucing (*Scyliorhinus canicular*) termasuk *temperate zone fish* yang ditemukan pada perairan beriklim subtropis di Laut Mediterania (Navarro *et al.*, 2018). Iklim subtropis dicirikan oleh musim panas yang panas dan kering, serta musim dingin yang sejuk dan lembap (FAO, 2012).

pH Optimum Tripsin Jeroan Ikan Bandeng Fraksi Terbaik

Penentuan pH optimum di uji aktivitasnya menggunakan buffer tris-HCl 0,05 M pH 5-9. Pengujian pH dapat menentukan kondisi optimum dari aktivitas enzim. Nurhayati *et al.* (2020) menjelaskan pelarut bufer tris-HCl berfungsi untuk menjaga kestabilan pH. Aktivitas tripsin pada berbagai pH (5-9) dapat dilihat pada *Figure 3*.

Aktivitas enzim meningkat seiring dengan meningkatnya pH yang digunakan dan mengalami penurunan pada pH 9.

Aktivitas enzim tertinggi pada pH 6 sebesar 0,673 U/mL. Hasil ini sesuai dengan penelitian sebelumnya oleh Santos *et al.* (2016) dan Barkia *et al.* (2010) dengan pH optimumnya adalah 9. Kenaikan pH (basa) atau penurunan pH (asam) dapat menyebabkan penurunan aktivitas enzim dengan cepat hingga menghentikan aktivitas katalitiknya. Hal ini terjadi karena struktur enzim mulai berubah sehingga substrat tidak dapat berikatan dengan sisi aktif enzim dan proses katalis tidak dapat berlangsung dengan sempurna. Profil aktivitas pH enzim menggambarkan pH pada saat gugus pemberi atau penerima proton yang penting pada sisi katalitik enzim berada dalam tingkat ionisasi yang diinginkan. pH optimum enzim tidak harus sama dengan pH lingkungan normalnya, dengan pH yang mungkin sedikit berada di atas atau di bawah pH optimum (Nurkhotimah, 2017).

Tingkat keasaman pH memengaruhi aktivitas enzim tripsin. Enzim tripsin menurut Benjakul *et al.* (1997) merupakan enzim yang termasuk protease alkali. Tripsin dapat mengikat substrat dengan baik pada kondisi basa dan sebaliknya pada kondisi asam karena enzim akan mengalami denaturasi pada pH asam. Penelitian Santos *et al.* (2016) membuktikan bahwa pada pH 4 dan 5 tripsin tidak memiliki aktivitas, sedangkan pada pH 6-11 menunjukkan adanya aktivitas, dengan

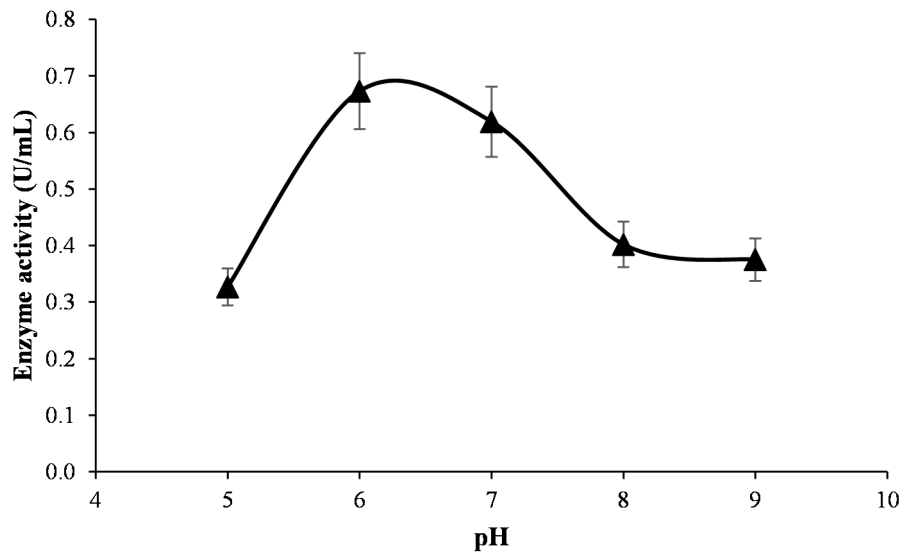


Figure 3 Trypsin activity of milkfish offal at 60°C at different pH

Gambar 3 Aktivitas tripsin jeroan ikan bandeng pada suhu 60°C dengan pH yang berbeda

aktivitas optimum pada pH 9. Secara umum pH optimum bervariasi karena perbedaan spesies, dan habitat asli masing masing ikan (Shahidi & Kamil, 2001).

Pengaruh NaCl dengan Konsentrasi Berbeda Aktivitas Tripsin Jeroan Ikan Bandeng

Pengujian NaCl dengan konsentrasi berbeda terhadap enzim tripsin dilakukan untuk melihat pengaruhnya terhadap aktivitas enzim. Hasil analisis pengaruh nilai NaCl 5-30% (b/v) terhadap aktivitas enzim dapat dilihat pada *Figure 4*. Enzim tripsin dari jeroan ikan bandeng mengalami peningkatan aktivitas pada konsentrasi 10%, yaitu 0,241 U/mL, lalu menurun seiring dengan meningkatnya konsentrasi NaCl yang digunakan. Barkia *et al.* (2010) dengan sampel ikan *Boops boops* melaporkan bahwa aktivitas relatif tripsin menunjukkan nilai 50% pada penambahan NaCl konsentrasi 35% (b/v). Balti *et al.* (2009) dengan sampel ikan *S. officinalis* melaporkan bahwa aktivitas relatif 39,4% pada konsentrasi NaCl 35% (b/v). Hal ini menunjukkan bahwa tripsin dari jeroan ikan bandeng mampu bekerja dalam kondisi garam yang tinggi.

Proses yang terjadi ketika penambahan konsentrasi garam yang terus meningkat disebut dengan *salting out*.

Peningkatan konsentrasi NaCl menyebabkan meningkatnya kekuatan ionik sehingga terjadinya penurunan aktivitas enzim oleh interaksi hidrofobik antara protein dan garam untuk berikatan dengan air (Kita *et al.*, 1994). Konsentrasi NaCl yang makin meningkat menunjukkan aktivitas enzim yang relatif stabil. Aktivitas enzim tripsin yang masih stabil pada penambahan garam yang cukup tinggi menunjukkan potensi enzim tripsin dari jeroan ikan bandeng ini dapat digunakan dalam pengolahan pangan yang membutuhkan penambahan garam yang tinggi misalnya hidrolisis protein pada pembuatan kecap ikan (Barkia *et al.*, 2010).

Pengaruh Ion Logam terhadap Aktivitas Tripsin Jeroan Ikan Bandeng

Jenis enzim memberikan reaksi yang berbeda terhadap beberapa jenis ion logam yang berbeda (Lehninger, 1997). Enzim tripsin yang mengandung ion NaCl, MnCl₂, ZnCl₂, CuCl₂, dan CaCl₂ mengalami penghambatan pada setiap jenis ion logam yang berbeda (*Table 2*).

Salah satu karakteristik aktivitas enzim adalah memerlukan kofaktor. Tidak semua enzim dapat bekerja sendiri. Kofaktor merupakan gugus non protein dari enzim yang menentukan aktivitas katalitiknya. Senyawa

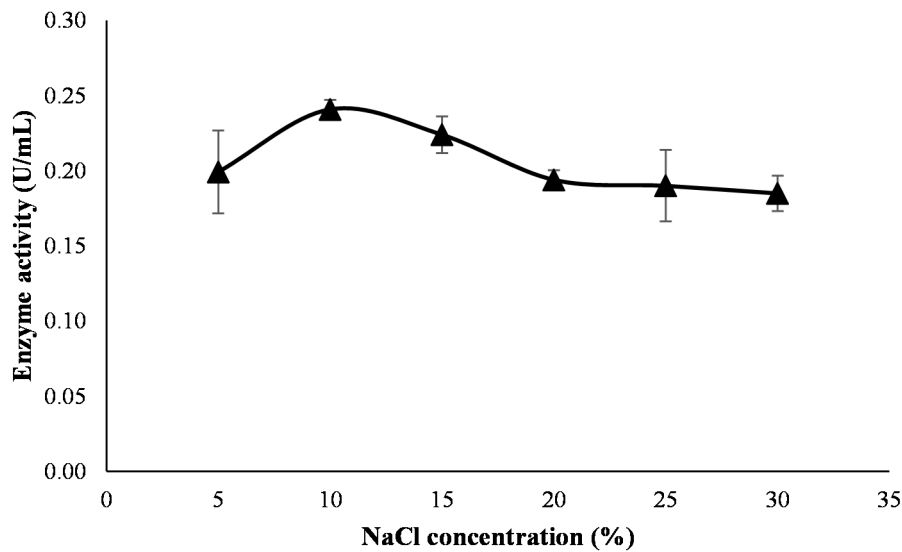


Figure 4 Stability of trypsin activity at NaCl 5-30%

Gambar 4 Stabilitas aktivitas tripsin pada NaCl 5-30%

Table 1 The impact of metal ions on trypsin activity from milkfish offal
Tabel 1 Pengaruh ion logam terhadap aktivitas tripsin jeroan ikan bandeng

Metal ion	Trypsin activity (%)
Control	100
NaCl	22,395±0,013
MnCl ₂	18,225±0,032
ZnCl ₂	19,857±0,010
CuCl ₂	19,131±0,075
CuCl ₂	20,582±0,015

kofaktor meliputi ion logam sederhana dan molekul organik (Wiseman, 1985). Senyawa kofaktor yang berupa ion logam ada yang berpotensi meningkatkan aktivitas kerja suatu enzim yang disebut sebagai aktivator enzim, dan ada yang menghambat aktivitas enzim atau disebut inhibitor enzim (Sumardjo, 2006). Barkia *et al.* (2010) melaporkan bahwa enzim tripsin yang diisolasi dari jeroan ikan *Bogou* nyata dihambat oleh ion Hg²⁺ hingga aktivitas relatifnya menjadi 28%.

Kinetika Tripsin Jeroan Ikan Bandeng

Kinetika enzim berkaitan dengan kecepatan katalisis enzim dan faktor faktor yang memengaruhinya. Konsentrasi substrat merupakan salah satu faktor yang memengaruhi aktivitas enzim (Wahyuni, 2017). Hasil analisis pengaruh konsentrasi

substrat dengan aktivitas tripsin dapat dilihat pada *Figure 5*.

Konsentrasi substrat 1-3,5 mM yang berbeda-beda menunjukkan bahwa terjadi peningkatan aktivitas enzim seiring dengan bertambahnya konsentrasi substrat. Aktivitas enzim terus meningkat dari konsentrasi 1 mM hingga mencapai konsentrasi 3 mM, kemudian mulai menurun pada konsentrasi substrat 3,5 mM. Aktivitas enzim pada konsentrasi substrat 1 mM, yaitu sebesar 0,207 U/mL. Aktivitas enzim tertinggi terdapat pada konsentrasi 3 mM dengan nilai sebesar 0,255 U/mL. Konsentrasi substrat 3,5 mM menunjukkan penurunan aktivitas enzim yang terjadi dengan nilai sebesar 0,203 U/mL.

Kecepatan reaksi (V_{maks}) dapat dihitung melalui persamaan *Lineweaver-Burk*. Hasil perhitungan *Lineweaver-Burk* didapatkan nilai V_{maks} sebesar 0,285 mmol/s. Nilai konstanta

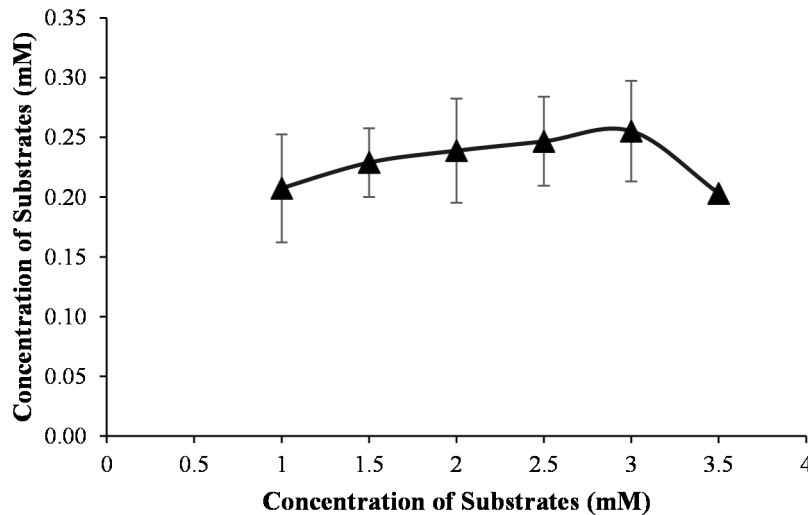


Figure 5 Trypsin activity at substrates concentration of 1-3.5 mM

Gambar 5 Aktivitas tripsin pada konsentrasi substrat 1-3,5 mM

(K_m) enzim menunjukkan konsentrasi substrat yang diperlukan enzim untuk mencapai setengah kelajuan maksimumnya. Menurut Lehninger (1997) nilai V_{maks} menunjukkan titik kondisi enzim menjadi jenuh oleh substrat dan tidak dapat berfungsi lebih cepat. Penambahan konsentrasi substrat yang makin tinggi setelah tercapainya titik ini, maka kecepatan reaksi akan mendekati, tetapi tidak akan pernah mencapai maksimum.

Nilai K_m tripsin jeroan ikan bandeng yang diperoleh, yaitu 0,374 mM. Nilai K_m tripsin yang diperoleh dari beberapa jenis ikan menunjukkan hasil yang berbeda. Nilai K_m pada ikan sardin (*Sardinella aurita*), yaitu 1,670 mM (Khaled *et al.*, 2008), *Mustelus mustelus* 0,387 (Bougatf *et al.*, 2010), *Paralichthys olivaceus* 0,017 mM (Kim & Jeong, 2012), dan *Luphiosilurus alexandri* 0,517 mM (Santos *et al.*, 2016).

Bobot Molekul Ekstrak Kasar dan Fraksi Terbaik

Berat molekul enzim dapat diukur menggunakan metode elektroforesis, yaitu *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE). Metode pendekatan elektroforesis ini untuk memisahkan protein (Arndt *et al.*, 2012). Ada atau tidaknya protein ditentukan melalui pewarnaan, dengan protein dalam gel diidentifikasi oleh pita yang terlihat (Atma

& Ramdhani, 2017). Hasil uji berat molekul untuk ekstrak kasar dan fraksi terbaik dapat dilihat pada *Figure 6*. Analisis bobot molekul dengan metode SDS-PAGE dari tiap perlakuan dilakukan dengan membandingkan hasil pengukuran tiap sampel dengan marker protein yang telah diketahui nilai bobot molekulnya. Marker protein yang digunakan memiliki nilai bobot molekul 10-250 kDa. Hasil analisis bobot molekul dari tiap sampel perlakuan dapat dilihat pada *Table 2*.

Hasil pengukuran bobot molekul dengan metode SDS-PAGE enzim tripsin menunjukkan nilai yang berbeda-beda. Nilai bobot molekul dari ekstrak kasar enzim tripsin yang terukur, yaitu sebesar 25,00 kDa dan nilai bobot molekul dari fraksi terbaik 20-30% diperoleh 23,601±0,632 kDa. Khantaphant & Benjakul (2010) menjelaskan secara umum tripsin dari ikan memiliki bobot molekul 20-30 kDa. Hal ini menandakan bahwa sampel tersebut mengandung enzim tripsin.

Khandagale *et al.* (2017) menemukan bahwa tripsin dari *Sardinella longiceps* memiliki berat molekul 24 kDa. Berat molekul limpa tuna (*Thunnus tonggol*) adalah 24 kDa (Klomklao *et al.*, 2004). Berat molekul tripsin dari jeroan *Acanthopagrus latus* adalah 23 kDa (Namjou *et al.*, 2019). Sampel ikan catla catla menunjukkan satu pita dengan berat molekul 20,2 kDa (Khangembam *et al.*, 2012). Sampel ikan kod memiliki berat 23,2 kDa, sedangkan

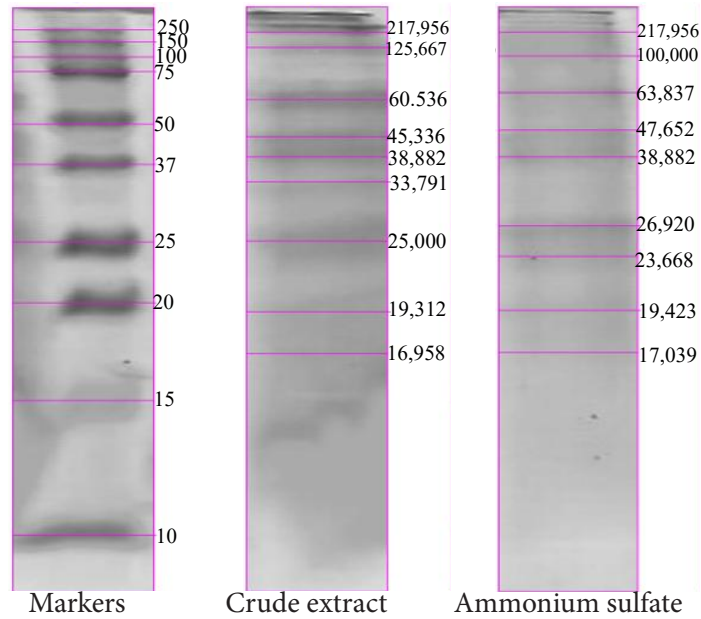


Figure 6 Molecular weight of crude extract and best faction 20-30% with SDS-PAGE method
 Gambar 6 Berat molekul ekstrak kasar dan fraksi terbaik 20-30% dengan metode SDS-PAGE

Table 2 Measurement of molecular weight of crude extract and best fraction 20-30%

Tabel 2 Pengukuran berat molekul ekstrak kasar dan fraksi terbaik 20-30%

No	Markers (kDa)	Crude extract (kDa)	Best faction 20-30%
1	250	217.956	217.956
2	150	125.667	100.000
3	100	60.536	63.837
4	75	45.336	47.652
5	50	38.882	38.882
6	37	33.791	26.920
7	25	25.000	23.668
8	20	19.312	19.312
9	15	16.958	16.958
10	10		

sampel ikan gadus morhua memiliki berat 24,2 kDa (Asgeirsson *et al.*, 1989). Trismillah *et al.* (2014) menemukan bahwa berat molekul jeroan ikan memiliki satu pita dengan nilai 23 kDa. Berat molekul tripsin dapat bervariasi tergantung pada jenis ikan yang digunakan.

KESIMPULAN

Ekstrak kasar tripsin dari jeroan ikan bandeng memiliki aktivitas sebesar 0,117 U/ mL. Aktivitas ekstrak kasar tripsin mengalami peningkatan setelah dilakukan pengendapan

pada fraksi amonium sulfat 20-30%, yaitu sebesar 0,295 U/mL. Enzim tersebut memiliki suhu pada 50°C dan pH optimum 6. Aktivitas enzim tripsin pada ion NaCl, MnCl₂, ZnCl₂, CuCl₂, dan CaCl₂ mengalami penghambatan pada setiap jenis ion logam yang berbeda. Aktivitas tripsin pada NaCl 5-30% meningkat pada 10%, yaitu sebesar 0,249 U/mL. Nilai V_{max} enzim ini adalah 0,285 mmol/s, dan nilai K_m-nya adalah 0,374 mM.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih atas pendanaan dari Kementerian Pendidikan, Kebudayaan, Riset dan Teknologi melalui Skema Penelitian Pascasarjana – Penelitian Tesis Magister (PPS-PTM) Tahun 2024 atas nama Prof. Dr. Tati Nurhayati S.Pi, M.Si dengan kontrak Nomor 22311/IT3.D10/PT.01.03/P/B/2024.

DAFTAR PUSTAKA

- Arndt, C., Koristka, S., Bartsch, H., & Bachmann M. (2012). Native polyacrylamide gels. *Methods in Molecular Biology*, 869, 49-53. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-821-4_5
- Asgeirsson, B., Fox, J. W., & Bjarnason, J. B. (1989). Purification and characterization of trypsin from the polikilotherm *Gadus morhua*. *European Journal of Biochemistry*, 180, 85-94.
- Atma, Y., & Ramdhani, H. (2017). Identifikasi gelatin dari tulang ikan patin hasil ekstraksi menggunakan kulit nanas dengan elektroforesis vertical. *Prosiding Seminar Nasional Sains dan Teknologi*, 1-7.
- Barkia, A., Bougatef, A., Nasri, R., Fetoui, E., Balti, R., & Nasri, M. (2010). Trypsin from the viscera of Bogue (*Boop boops*): isolation and characterization. *Fish Physiology Biochemistry*, 36, 893-902. <https://doi.org/10.1007/s10695-009-9365-z>
- Burgess, R. R. (2009). Protein precipitation techniques. Di dalam: Burgess dan Murray, editor. *Methods in Enzymology volume 463*. Wisconsin (US): Elsevier Inc. hlm 331-342.
- BPPT [Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi]. 2014. *Menuju kemandirian enzim nasional*. <https://inspektorat.bppt.go.id/>.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- [CCI] Citra Cendekia Indonesia. 2017. Perkembangan Impor Enzim Indonesia. Diperoleh dari <http://cci-indonesia.com/perkembangan-impor-enzim-indonesia/>
- Churry. 2017 Apr 29. BPPT-Petrosida Gresik Resmikan Pabrik Enzim Pertama di Indonesia. It Works.
- Falch, E. A. (1991). Industrial enzymes developments in production and application. *Biotechnology advances*, 9(4), 643-658.
- Fitriani, E. (2003). Aktivitas enzim karboksimetil selulase *Bacillus pumilus* galur 55 pada berbagai suhu inkubasi. Bogor: Kimia FMIPA IPB.
- [GVR] Grand View Research. (2020). *Enzymes Market Size, Share & Trends Analysis Report by Product (Lipases, Polymerases & Nucleases, Carbohydrase), by Type (Industrial, Specialty), by Source (Plants, Animals), by Region, and Segment Forecasts, 2022 - 2030*.
- Ketnawa, S., Benjakul, S., Martinez-Alvarez, O., & Rawdkuen, S. (2017). Fish skin gelatin hydrolysates produced by visceral peptidase and bovine trypsin: bioactivity and stability. *Food Chemistry*, 215, 383-390.
- Khaled, H. B., Jellouni, K., Souissi, N., Ghorbel, S., Barkia, A., & Nasri, M. (2011). Purification and characterization of three trypsin isoforms from viscera of sardinelle (*Sardinella aurita*). *Food Chemistry*, 37, 123-133. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.014>
- Khandagale, A. S., Mundodi, L., & Sarojini, B. K. (2017). Isolation and characterization of trypsin from fish viscera of oil sardine (*Sardinella longiceps*). *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 5(2), 33-37.
- Khangembam, B. K., Yadavilli, K. S., & Chakrabarti, R. (2012). Purification and characterization of trypsin from the digestive system of carp Catla catla (*Hamilton*). *International Aquatic Research*, 4(1), 1-12. <https://doi.org/10.1186/2008-6970-4-9>
- Khantaphan, S., & Benjakul, S. (2010). Purification and characterization of trypsin from the pyloric caeca of



- brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*). *Food Chemistry*, 120, 658–664. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.098>
- Kim, M., & Jeong, Y. (2015). Purification and characterization of trypsin-like protease from falftish (*paralichthy olivaceus*) intestine. *Journal of Food Biochemistry*, 37, 732-741.
- Kita, Y., Arakawa, T., Lin, T. Y., & Timasheff, S. (1994). Contribution of the surface free energy perturbations to protein solvent interactions. *Biochemistry*, 33, 15178-15189.
- [KKP] Kementerian Kelautan dan Perikanan. (2023). Statistik Kelautan dan Perikanan 2023. Jakarta: Kementerian Kelautan dan Perikanan.
- Klomklao, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kishimura, H., Simpson, B. K., & Saeki, H. (2007). Trypsins from yellowfin tuna (*Thunnus albacores*) spleen: Purification and characterization. *Comparative Biochemistry and Physiology*, B (144), 47–56.
- Klomklao, S., Benjakul, S., & Visessanguan, W. (2004). Comparative studies on proteolytic activity of splenic extract from three tuna species commonly used in Thailand. *Journal of Food Biochemistry*, 28(5): 355–372. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2004.05203.x>
- Ktari, N., Khaled, H. B., Nasri, R., Jellouli, K., Ghorbel, S., & Nasri, M. (2012). Trypsin from zebra blenny (*Salaria basilisca*) viscera: purification, characterization and potential application as a detergent additive. *Food Chemistry*, 130, 467–474. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.015>
- Lehninger, A. L. (1997). *Dasar-Dasar Biokimia*. Thenawidjaja M, penerjemah; Suwarman, editor. Jakarta (ID): Penerbit Erlangga. Terjemahan dari: *Principle of Biochemistry*.
- Liu, H., Zhou, X., Tian, S., Hao, X., You, J., & Zhang, Y. (2014). Two-step transpeptidation of the insulin precursor expressed in *Pichia pastoris* to insulin ester via trypsin-catalyzed cleavage and coupling. *Biotechnol Appl Biochem*, 61(4), 408-417.
- Liu, H., Zhou, X., Xie, F., You, J., & Zhang, Y. (2013). An efficient trypsin digestion strategy for improving desB30 productivity from recombinant human insulin precursor fusion protein. *Process Biochem*, 48(5-6), 965-971.
- Mao, Y. H., Krischke, M., Hengst, C., & Kulozik, U. (2018). Comparison of the influence of pH on the selectivity of free and immobilized trypsin for beta-lactoglobulin hydrolysis. *Food Chemistry*, 253, 194–202.
- Muallifa, A. Y. (2017). Mengurai hadis tahnik dan gerakan anti vaksin. *Jurnal Living Hadis*, 2(2), 253-269.
- Namjou, F., Yeganeh, S., Madani, R., & Ouraji, H. (2019). Extraction, purification, and characterization of trypsin obtained from the digestive system of yellowfin seabream (*Acanthopagrus latus*). *Archives of Razi Institute*, 74(4), 405-411. <https://doi.org/10.22092/ari.2018.122854.1229>
- Nurhayati, T., Nugraha, R., & Lihuana, D. N. (2020). Karakterisasi fraksi ammonium sulfat tripsin yang diisolasi dari usus ikan tongkol (*Euthynnus affinis*). *Jurnal Pengolahan Hasil perikanan Indonesia*, 23(2), 372-382.
- Nurhayati, T., Arbajayanti, R. D., & Nurilmala, M. (2021). Komponen asam amino dan aktivitas enzim tripsin dari usus tuna sirip kuning (*Thunnus albacares*) dan kakap merah (*Lutjanus campechanus*). *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 24(1), 97-106.
- Nurhayati, T., Ramadhan, W., & Raharja, T. F. K. (2022, June). Microencapsulation of trypsin from the intestine of yellowfin tuna (*Thunnus Albacares*). In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (1033(1) p. 012058). IOP Publishing.
- Nurhayati, T., Abdullah, A., Rahmawati, S., Kurniawan, R. (2024). Characteristics of trypsin isolated from intestines different of fish and correlation toward trypsin activity. *Squalen Bulletin Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology*, 19(2), 131-143. <https://doi.org/10.15578/squalen.904>
- Parfitt, K. (1999). *Martindale and Complete*

- Drug Reference*. Ed ke-13. (USA): Pharmaceutical Press.
- Ranasasmita, R. (2015). Kehalalan produk obat-obatan, terutama obat herbal. Di dalam: Ranasasmita R, Roswiem AP, editor. *Prosiding Simposium Penelitian Bahan Obat Alami XIV* [Internet] terutama obat herbal. Prosiding Simposium Penelitian Bahan Obat Alami. 2014; 14, 552–9.
- RISTEKDIKTI [Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi Republik Indonesia]. 2017. *Kemandirian Produk Enzim Indonesia*. [Internet]. Tersedia pada: <https://www.ristekdikti.go.id/kabar/kemandirian-produk-enzim-indonesia/#cje158Ws3gvTW5vt.99>.
- Silva, J. F., Esposito, T. S., Marchuschi, M., Ribeiro, K., Cavalli, R. O., Oliveira, V., & Bezerra, R. S. (2011). Purification and partial characterization of a trypsin from the processing waste of the silver mojarra (*Diapterus rhombeus*). *Food Chemistry*, 129(3), 777-782.
- Sinaga, M., Nugroho, T. T., & Dahliaty, A. (2014). Pemekatan enzim selulase *Penicillium* sp. LBKURCC20 dengan pengendapan amonium sulfat 80%. *Jurnal Online Mahasiswa Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Riau*, 1(2), 283-288.
- Trismillah, Sumaryono, W., Malik, A., & Sadikin, M. (2014). Isolasi dan karakterisasi protease serupa (PST) dari *Lactobacillus plantarum* FNCC 0270. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 12(1), 57-66.
- Zhang, Y., Liang, Q., Zhang, C., Zhang, J., Du, G., & Kang, Z. (2020). Improving production of *Streptomyces griseus* trypsin for enzymatic processing of insulin precursor. *Microbial Cell Factories*, 19(1), 1-11.