

KARAKTERISTIK FUNGSIONAL HIDROLISAT KOLAGEN KULIT TUNA YANG DIHIDROLISIS DENGAN PEPSIN DARI LAMBUNG TUNA

Roisul Adi Brilianto Muttaqin, Tati Nurhayati*, Asadatun Abdullah

Departemen Teknologi Hasil Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, IPB University
Jalan Agatis, Dramaga, Kabupaten Bogor, Jawa Barat Indonesia 16128

Dikirim: 7 Desember 2025/Disetujui: 8 Mei 2026

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

Cara sitasi (APA Style 7th): Muttaqin, R. A. B., Nurhayati, T., & Abdullah, A. (2026). Karakteristik fungsional hidrolisat kolagen kulit tuna yang dihidrolisis dengan pepsin dari lambung tuna. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 29(5), 435-450. <http://dx.doi.org/10.17844/6606j042>

Abstrak

Hidrolisis kolagen dapat dilakukan menggunakan metode ekstraksi pelarut, degradasi kimia, fermentasi dan enzimatik. Produk hidrolisat yang dihidrolisis menggunakan enzim, memiliki peptida bioaktif yang bermanfaat bagi kesehatan. Motif spesifik yang dihasilkan dalam proses hidrolisis misalnya urutan prolina/hidroksiprolina dan glisina, atau prolina di C-terminus sering dikaitkan dengan bioaktivitas inhibisi ACE atau efek antioksidan. Hidrolisat dapat diproduksi dengan bahan baku hasil samping produk perikanan berupa kulit ikan tuna sirip kuning sebagai kolagen dan lambung tuna sebagai sumber pepsin penghidrolisis kolagen. Penelitian bertujuan menentukan aktivitas pepsin dan suhu hidrolisis terbaik dalam menghasilkan hidrolisat kolagen yang dihidrolisis pepsin lambung tuna. Penelitian terdiri dari dua tahap, yaitu ekstraksi pepsin dari lambung ikan tuna sirip kuning dan pembuatan hidrolisat kolagen secara enzimatis menggunakan enzim pepsin. Aktivitas yang digunakan, yaitu 6.000, 9.000 dan 12.000 U dan suhu 40, 50 dan 60. Ekstrak pepsin yang diperoleh memiliki aktivitas sebesar 12.332 U/mg. Uji aktivitas antioksidan ABTS diperoleh nilai IC_{50} paling baik pada perlakuan hidrolisis suhu 50°C, dengan nilai yang diperoleh perlakuan 6.000 U sebesar 109 ppm, perlakuan 9.000 U sebesar 59 ppm, dan perlakuan 12.000 U sebesar 230 ppm. Aktivitas antioksidan DPPH diperoleh nilai IC_{50} paling baik pada perlakuan hidrolisis suhu 40°C, dengan nilai masing masing 232 ppm, 194 ppm, dan 531 ppm. Hidrolisat kolagen pada konsentrasi 1,7 mg/mL protein setiap perlakuannya, memperoleh nilai inhibisi pada rentang 40-66%.

Kata kunci: antioksidan, bobot molekul, derajat hidrolisis, inhibitor ACE, peptida

Functional Characteristics of Tuna Skin Collagen Hydrolyzed by Tuna Gastric Pepsin

Abstract

Collagen hydrolysis can be performed using solvent extraction, chemical degradation, fermentation, and enzymatic methods, among others. Hydrolysates produced using enzymes contain bioactive peptides that are beneficial for health. Specific motifs produced during hydrolysis, such as proline/hydroxyproline and glycine sequences, or proline at the C-terminus, are often associated with ACE-inhibitory bioactivity or antioxidant effects. Hydrolysates can be produced using byproducts of the fisheries industry, such as yellowfin tuna skin as a source of collagen and tuna stomach as a source of collagen-hydrolyzing pepsin. This study aimed to identify the optimal pepsin activity and hydrolysis temperature for producing collagen hydrolysate using pepsin derived from tuna stomach. The research was conducted in two stages: extraction of pepsin from the stomach of yellowfin tuna and production of enzymatic collagen hydrolysate using pepsin.

The activities tested were 6,000, 9,000, and 12,000 U, with temperatures set at 40, 50, and 60°C. The extracted pepsin exhibited an activity of 12,332 U/mg pepsin. The ABTS antioxidant activity test revealed that the best IC_{50} value was achieved during hydrolysis at 50 °C, with values of 109 ppm for the 6,000 U treatment, 59 ppm for the 9,000 U treatment, and 230 ppm for the 12,000 U treatment. The most favorable IC_{50} value for DPPH antioxidant activity was observed during hydrolysis at 40°C, with respective values of 232, 194, and 531 ppm. Collagen hydrolysates at a concentration of 1.7 mg/mL of protein in each treatment showed inhibition values in the range of 40–66%.

Keywords: ACE inhibitor, antioxidant, degree of hydrolysis, molecular weight, peptide

PENDAHULUAN

Protein dalam makanan tidak hanya berfungsi sebagai nutrisi tetapi juga melakukan peran fisikokimia yang meningkatkan kesehatan. Sebagian besar aktivitas fisiologis protein dilakukan oleh urutan peptida yang dienskripsi dalam protein induk yang menjadi aktif saat dibelah secara utuh. Peptida bioaktif dilepaskan selama proteolisis enzimatis protein (pencernaan gastrointestinal, hidrolisis *in vitro* menggunakan enzim proteolitik) dan juga selama pengolahan makanan (memasak, fermentasi, pematangan) (Rizello *et al.*, 2016). Polipeptida kolagen yang dihidrolisis akan dipecah menjadi molekul sederhana menggunakan larutan asam, basa atau enzim. Proses hidrolisis memecah struktur heliks rangkap tiga kolagen, memotong rantai polipeptida, dan menghasilkan peptida berbobot molekul rendah dengan kelarutan, viskositas, dan muatan yang sangat berbeda dari kolagen alami (Ma *et al.*, 2025). Peptida bioaktif dienskripsi dalam struktur primer protein dan tidak aktif sebelum dilepaskan oleh berbagai metode hidrolisis. Dibandingkan dengan metode lain, yaitu ekstraksi pelarut, degradasi kimia, dan fermentasi mikroba, hidrolisis enzimatis adalah metode yang paling populer dan efektif untuk memperoleh hidrolisat protein karena karakteristik operasinya yang sederhana dan tidak merusak lingkungan (Cai *et al.*, 2022). Kondisi enzimatis yang berbeda pada sumber kolagen yang sama menghasilkan hidrolisat dengan pola peptida yang berbeda serta bioaktivitas yang berbeda. Bioaktivitas yang dihasilkan bergantung pada urutan, komposisi asam amino, panjang rantai, dan residu C-terminal. Motif spesifik (misalnya, urutan kaya prolina/hidroksiprolina dan

glisina, atau prolina di C-terminus) sering dikaitkan dengan penghambatan ACE yang lebih kuat, proliferasi fibroblas, atau efek antioksidan (Otzug, 2024). Sumber bahan baku kolagen dapat diperoleh pada bahan hasil samping industri perikanan contohnya kulit, tulang dan gelembung renang.

Industri tuna merupakan salah satu industri yang dinamis. Industri perikanan tuna mendominasi ekspor hasil perikanan di Indonesia. Total volume ekspor pada tahun 2019 sebesar 168.433 ton dengan nilai 713,9 juta US\$ dengan empat kategori produk olahan utama yaitu tuna kaleng sebesar 82.234 ton, filet beku sebesar 58.871 ton, tuna beku sebesar 24.261 ton dan tuna segar sebesar 3.067 ton (KKP, 2020). Tulang, kepala, jeroan, dan sisik ikan merupakan hasil samping yang dihasilkan dari proses industri produk olahan tuna. Hasil samping yang dihasilkan dapat mencapai 20-60% dari bahan baku. Pengolah tuna memanfaatkan bagian daging tuna untuk produksi produk utama mereka. Daging tuna mencakup 62% dari total komposisi ikan, bagian lainnya adalah kepala (13%), organ dalam (8%), tulang (6%), sirip (1%) dan kulit (10%) (FAO 2013). Hasil samping yang diperoleh dalam industri tuna memiliki potensi dalam pengolahan lanjut menjadi produk dengan nilai ekonomis tinggi, contohnya jeroan dan kulit tuna. Jeroan ikan tuna, yaitu bagian perut (lambung) tuna, dapat digunakan sebagai sumber potensial enzim pepsin (Patil *et al.*, 2023), sedangkan kulit merupakan sumber protein kolagen dalam produksi peptida.

Penelitian mengenai pemanfaatan hasil samping berupa jeroan dalam produksi proteasetelah dilakukan misalnya dari lambung tuna sirip kuning (Pasaribu *et al.*, 2013),



lambung ikan bandeng dan lele (Nurhayati *et al.*, 2020), serta lambung ikan cakalang (Soleh *et al.*, 2020). Lebih lanjut penelitian pemanfaatan hasil samping lambung ikan tidak terbatas hanya pada isolasi pepsin saja namun dilanjutkan dalam pengaplikasiannya dalam produk lanjutan misalnya ekstraksi kolagen (Nurjanah *et al.*, 2021), pembuatan pepton (Saputra & Nurhayati 2013; Nurhayati *et al.*, 2023), teknik mikroenkapsulasi untuk menghasilkan produk enzim bubuk (Nurhayati *et al.*, 2022a) dan pengempukan daging (Nurhayati *et al.*, 2022b; Kurniawan *et al.*, 2024). Hidrolisis kolagen dapat dilakukan dengan enzim pepsin yang dihasilkan dari lambung ikan. Pepsin merupakan enzim pencernaan utama yang berasal dari lambung hewan dan disekresikan sebagai pepsinogen dari sel-sel utama kelenjar oksintik pada epitel dinding lambung. Produk yang dihidrolisis menggunakan enzim, dilaporkan memiliki peptida bioaktif yang bermanfaat bagi kesehatan. Peptida dengan bobot molekul rendah, membuatnya lebih mudah diserap oleh tubuh. Peptida yang lebih kecil dalam hidrolisat kolagen menunjukkan aktivitas biologis, misalnya antioksidan dan inhibitor ACE (Baehaki *et al.*, 2016; Putalan *et al.*, 2018; Putalan *et al.*, 2020; Cai *et al.*, 2021; Abdullah *et al.*, 2022). Peptida kolagen penghambat enzim pengubah angiotensin I merupakan peptida aktif kolagen yang menjanjikan di pasaran. Peptida yang memiliki aktivitas inhibitor ACE dapat mencegah dan mengobati hipertensi dengan menghalangi aktivasi sistem renin-angiotensin (Udenigwe & Mohan, 2014). Dibandingkan dengan peptida fungsional bernilai tambah tinggi lainnya, penelitian dan pengembangan peptida inhibitor ACE kolagen dalam produksi industri berjalan lambat, dan peptida inhibitor ACE kolagen jarang terlihat di pasaran. Oleh karena itu diperlukan penelitian peptida bioaktif yang potensial memiliki sifat fungsional inhibitor ACE menggunakan hasil samping kulit ikan tuna sebagai sumber peptida bioaktif dan lambung tuna sebagai sumber pepsin yang menghidrolisis kolagen. Penelitian bertujuan menentukan kondisi hidrolisis paling baik, dalam memperoleh hidrolisat dengan

kemampuan inhibitor ACE dan antioksidan potensial. Aktivitas enzim biasanya meningkat seiring dengan peningkatan suhu hingga mencapai suhu optimum spesifik sistem dalam berbagai reaksi hidrolisis, sehingga hubungan keduanya menjadi variabel dalam kajian ini. Hasil penelitian ini diharapkan akan tersedia peptida bioaktif dengan kemampuan aktivitas biologis berupa inhibitor ACE yang berpotensi sebagai alternatif untuk mencegah dan mengatasi permasalahan hipertensi.

BAHAN DAN METODE

Ekstraksi Pepsinogen Lambung Tuna Sirip Kuning

Sampel diperoleh dalam keadaan beku dari Bangka Belitung, sampel dikemas dengan stirofoam berisi es, dikirim menggunakan kapal dan diantarkan ke laboratorium menggunakan mobil pengangkut. Sampel selanjutnya dicairkan dan dibersihkan dari sisa isi perut dan darah dalam lambung menggunakan air mengalir. Lambung yang sudah bersih diukur morfometriknya baik dari panjang tebal dan diameternya, kemudian dipotong kecil menjadi ukuran 1×1 cm menggunakan pisau. Selanjutnya diekstraksi menjadi pepsinogen mengikuti Bougateg *et al.* (2008). Tahapannya diawali dengan pemberian nitrogen, lalu dihaluskan menggunakan blender. Proses ekstraksi dilakukan dengan buffer tris-HCl pH 7,5. Campuran yang telah diperoleh kemudian disentrifugasi (FC5718R 120V) selama 15 menit pada 10.000 g pada suhu 4°C. Supernatan yang diperoleh disebut pepsinogen.

Aktivasi Pepsin

Aktivasi pepsin dilakukan mengikuti Jurado *et al.* (2012) dengan menurunkan pH pepsinogen menjadi 2 melalui penambahan HCl 3 N (Emsure) dan dibiarkan selama 10 menit, kemudian ditambahkan NaHCO₃ 2 N (Emsure) untuk menaikkan pH menjadi 2,75. Sampel diendapkan selama 6 jam, disaring untuk menghasilkan supernatan berupa larutan pepsin. Pepsin yang diperoleh dilakukan uji aktivitas pepsin dan konsentrasi protein untuk menentukan aktivitas spesifik pepsin yang dihasilkan.

Preparasi Kulit Tuna

Kulit tuna diperoleh dalam keadaan beku. Selanjutnya kulit dicairkan dan dibersihkan dengan air mengalir. Pembersihan kulit tuna bertujuan untuk menghilangkan kotoran dan benda asing. Kulit dibersihkan dari sisik dan daging yang masih tersisa.

Pretreatment

Tahap *pretreatment* kulit ikan tuna dilakukan mengikuti (Nalinanon *et al.*, 2010) dengan modifikasi. *Pretreatment* dilakukan melalui dua tahap yaitu deproteinasi dan delipidasi. Proses ini dilakukan pada suhu 10°C dengan merendam kulit ikan dalam larutan NaOH (Emsure) 0,1 M 1:10 (b/v) selama 12 jam. Larutan NaOH diganti setiap 2 jam. Kulit ikan dicuci dengan akuades hingga pH netral. Selanjutnya sampel dilakukan proses penghilangan lemak dengan larutan butil alkohol (Emsure) 10% selama 18 jam dengan penggantian setiap 6 jam, kemudian dicuci dengan akuades. Sampel hasil *pretreatment* direndam dengan pelarut asam asetat (Emsure) 0,1 M dengan perbandingan kulit dan pelarut yaitu 1:10 (b/v) pada suhu 10°C. Perendaman dilakukan selama 24 jam. Setelah 24 jam campuran disaring, dipisahkan antara larutan dan *swollen skin* (sampel kulit) yang dihasilkan.

Hidrolisis Kulit Tuna

Swollen skin yang diperoleh dihidrolisis dengan enzim pepsin mengikuti penelitian Benjakul *et al.* (2017) dan Benhabiles *et al.* (2012) dengan modifikasi. Hidrolisis dilakukan menggunakan enzim pepsin dengan perbandingan sampel dan pepsin 1:2 (b/v) dengan aktivitas bertingkat, pada suhu 40, 50, 60°C menggunakan waterbath selama 4 jam. Setelah selesai, sampel dilakukan proses inaktivasi enzim dengan suhu 90°C dengan *waterbath* selama 15 menit. Hidrolisat yang dihasilkan disentrifugasi (FC5718R 120V) dengan kecepatan 10.000 g selama 10 menit. Hasil supernatan yang diperoleh merupakan hidrolisat kolagen.

Analisis Aktivitas Pepsin

Analisis aktivitas pepsin berdasarkan literatur dari Bougatef *et al.* (2008); Jurado

et al. (2012) dengan modifikasi dilakukan menggunakan haemoglobin sapi sebagai substratnya. Substrat dilarutkan dengan tris-HCl 10 mM pH 2 dengan konsentrasi 2%. Substrat diambil sebanyak 0,625 mL ke dalam tabung mikro dan ditambahkan pepsin sebanyak 0,125 mL setelah itu dihomogenkan dan diinkubasi dalam kurun waktu 15 menit pada suhu 50°C. Penambahan TCA 10% kemudian dilakukan sebanyak 0,4 mL untuk menghentikan reaksi. Sampel larutan disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 g dalam waktu 10 menit. Pembuatan blanko dilakukan dengan mencampurkan hemoglobin dan akuades. Supernatan diambil dan ditentukan nilai absorbansinya pada panjang gelombang 280 nm. Unit aktivitas pepsin didefinisikan sebagai peningkatan absorbansi 0,001 per menit, sehingga aktivitas pepsin dapat dinyatakan sebagai berikut:

$$U = \frac{A_{280} - A_0}{0,01 \times t \times VE}$$

Keterangan:

U = unit aktivitas (AU/mL)
 A₂₈₀ = absorbansi pada panjang gelombang 280
 A₀ = absorbansi blanko
 VE = volume enzim
 t = waktu inkubasi

Analisis Konsentrasi Protein

Analisis Konsentrasi Protein dilakukan dengan metode Bradford (1976). Pembuatan larutan standar dilakukan dengan melarutkan *bovine serum albumin* (BSA) dengan konsentrasi 2 mg/mL yang dijadikan sebagai larutan stok. Larutan stok standar kemudian diberi rentang standar pada konsentrasi berkisar 0,1-1,0 mg/mL. Larutan standar diukur nilai absorbansi dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm.

Analisis Histologi

Analisis histologi dilakukan berdasarkan Angka *et al.* (1990), diawali dengan persiapan dan pengamatan sediaan di bawah mikroskop cahaya. Kulit (1×1×0,5 cm²) digosok dengan larutan fiksatif BNF, kemudian didehidrasi menggunakan alkohol



standar dengan rentang 70% selama 24 jam, 80% selama 2 jam, 90% selama dua jam, 95% selama 2 jam, dan 100% selama 12 jam. Sampel kemudian dibersihkan dengan merendam sampel dalam cairan alkohol mendidih: xylol (1:1) selama 30 menit, diikuti oleh fase impregnasi (*embedding*). Fase *embedding* menghilangkan zat pembersih dari jaringan dan menggantinya dengan parafin. Sampel direndam dalam larutan xilena: parafin (1:1) dalam gelas kaca selama 45 menit dalam oven pada suhu 60°C. Sampel kemudian dicetak dengan parafin cair hingga 1/8 bagian dari ukuran cetakan (2×2×2) cm³ hingga agak beku. Parafin cair selanjutnya diberikan hingga meresap dan dibiarkan membeku pada suhu kamar selama 24 jam. Sampel yang berbentuk blok parafin kemudian dirapikan menggunakan silette dan dipotong dengan ketebalan 4 µm menggunakan mikrotom berputar untuk mendapatkan slide yang telah disiapkan.

Analisis Bobot Molekul

Analisis Bobot Molekul dilakukan dengan metode SDS-PAGE (Laemmli 1970). Sampel sebanyak 2 mg dilarutkan dalam 1 mL *sodium dodecyl sulfate* (SDS) 5% dan campuran diinkubasi pada suhu 85°C selama 1 jam dalam *waterbath* yang suhunya terkontrol. Campuran disentrifugasi pada 4.000 g selama 5 menit pada suhu kamar. Supernatan yang diperoleh dicampur dengan bufer (tris HCl 60 mM, pH 6,8 mengandung 2% SDS dan 25% gliserol) dengan rasio 1:1 (v/v) dan mengandung 10% β-merkaptotanol (β-ME). Campuran dipanaskan dalam air mendidih selama 2 menit. Sampel sebanyak 5 µL dimasukkan ke dalam gel *polyacrylamide* yang terdiri dari 7,5% *running gel* dan 3% *stacking gel*. Marker yang digunakan yaitu marker protein *coomassie blue staining* dengan bobot molekul 10-250 kDa. Elektroforesis dijalankan secara konstan pada arus 13 mA dan tegangan 100 volt selama 2 jam. Gel dikeluarkan dari slab kaca kemudian dilakukan proses *staining* dan *destaining*. Proses *staining* dengan *coomassie brilliant blue* selama 1 jam, sedangkan *destaining* selama kurang lebih 2 jam hingga pita-pita protein terlihat jelas.

Analisis Derajat Hidrolisis

Derajat hidrolisis dihitung berdasarkan rasio *trichloroacetic acid* (TCA) mengikuti metode Hoyle dan Merritt (1994). Sebanyak 20 mL hidrolisat ditambahkan TCA 20% sebanyak 20 mL, lalu didiamkan selama 30 menit. Selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 7,800 g selama 15 menit. Supernatan diambil dan dianalisis kandungan nitrogennya dengan metode Kjeldhal (AOAC 2005).

$$DH(\%) = \frac{\text{Nitrogen terlarut TCA}}{\text{Total nitrogen sampel}} \times 100\%$$

Aktivitas Antioksidan

Pengujian aktivitas antioksidan dapat dilakukan menggunakan metode *2,2'-azino-bis ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid* (ABTS) berdasarkan Re *et al.* (1999) dengan modifikasi dan *2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl* (DPPH) mengikuti Viji *et al.* (2019) dengan modifikasi. Preparasi reagen ABTS dilakukan dengan mencampurkan ABTS (7,4 mM) dengan K₂S₂O₈ (2,6 mM). Reagen yang telah dicampurkan tersebut dilakukan inkubasi selama 18 jam dalam suhu ruang. Reagen yang telah diinkubasi kemudian diencerkan menggunakan etanol hingga diperoleh nilai absorbansi sebesar 0,8 pada panjang gelombang 734 nm. Reagen DPPH dibuat dengan mencampurkan DPPH 5 mg dengan metanol 50 mL untuk membuat reagen DPPH 100 ppm. Sampel yang akan diuji dilakukan pengenceran menggunakan akuades dengan konsentrasi bertingkat (20, 50, 100, 200, 250 ppm) untuk menentukan nilai IC₅₀ sampel uji. Sampel disiapkan sebanyak 1 mL kemudian ditambahkan reagen ABTS sebanyak 1 mL. Campuran tersebut didiamkan selama kurang lebih 10 menit pada suhu ruang. Absorbansi dari campuran diukur menggunakan panjang gelombang 734 nm. Pengujian DPPH dilakukan pada panjang gelombang 517 nm. Persentase aktivitas antioksidan atau inhibisi (penghambatan) dapat dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Inhibisi} = \frac{A_0 - A_s}{A_0} \times 100\%$$

Keterangan:

A₀ = absorbansi blangko

A_s = absorbansi sampel

Aktivitas Inhibitor ACE

Aktivitas penghambat *angiotensin converting enzyme* (ACE) diukur berdasarkan laju pembentukan asam hippurat dari *hippuryl-L-histidyl-L-leusine* (HHL) mengikuti metode Arihara *et al.* (2001). Pengujian dilakukan dengan dengan 4 jenis variabel berupa kontrol (ACE+substrat), blangko kontrol (substrat+akuades), sampel (ACE+substrat+sampel) dan blangko sampel (sampel+substrat). Sampel 50 µL (10 mg/mL) ditambah 125 µL buffer substrat (7.6 mM HHL dan 608 mM NaCl dalam 10 mL buffer borat pH 8.3) campuran diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit. Selanjutnya 50 µL enzim ACE 50 mU/mL ditambahkan pada campuran kemudian diinkubasi selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 200 µL HCl 1 N. Campuran divortex, ditambah dengan 1140 µL etil asetat kemudian disentrifugasi 10.000 g selama 10 menit. Supernatan sebanyak 800 µL diambil dan dikeringkan pada suhu 95°C selama 90 menit. Asam hipurat yang terbentuk dilarutkan ke dalam 2 mL akuabides. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 228 nm menggunakan spektro UV-Vis. Perhitungan aktivitas inhibitor ACE yaitu sebagai berikut:

$$\text{Inhibisi ACE} = \frac{(A-B) - (C-D)}{A-B} \times 100\%$$

Keterangan:

- A = absorbansi kontrol (ACE+substrat)
- B = absorbansi blangko kontrol (substrat+akuades)
- C = absorbansi sampel (ACE+substrat+sampel)
- D = absorbansi blangko sampel (sampel+substrat)

Analisis Data

Rancangan penelitian dilakukan menggunakan rancangan acak lengkap faktorial (RALF) dengan 2 faktor. Proses hidrolisis terdiri atas faktor perbedaan aktivitas enzim penghidrolisis dan suhu hidrolisis dengan masing-masing 3 kali ulangan. Data pengamatan terlebih dahulu diuji normalitas dan homogenitas, kemudian dianalisis menggunakan analisis ragam (ANOVA) yang dilanjutkan dengan uji Tukey pada taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik Pepsin Lambung Tuna Sirip Kuning

Pepsin merupakan enzim pencernaan utama yang berasal dari lambung hewan dan disekresikan sebagai pepsinogen dari sel-sel utama kelenjar oksintik pada epitel dinding lambung. Lambung merupakan organ yang berfungsi sebagai tempat penampungan makanan untuk dicerna dan dihancurkan. Kenampakan dari lambung tuna berwarna merah pucat dengan tekstur berserat pada bagian dalam lambung (*Figure 1*).

Hasil rata-rata pengukuran morfometrik (n13) yang diperoleh pada lambung tuna sirip kuning adalah panjang $30,58 \pm 0,4$ cm; lebar $7,38 \pm 0,58$ cm dan bobot $202,85 \pm 16,17$ g. Selanjutnya lambung dilumatkan untuk mengekstraksi pepsin. Enzim pepsin yang diperoleh selanjutnya diuji kemampuan aktivitas dan konsentrasi proteinnya. Aktivitas pepsin dan konsentrasi protein disajikan pada *Table 1*.

Nilai rerata aktivitas pepsin yang diperoleh adalah 5.697,78 U/mL dengan nilai konsentrasi protein 0,48 mg/mL sehingga aktivitas spesifik yang diperoleh adalah 12.332,91 U/mg. Nalinanon *et al.* (2010) melaporkan ekstraksi enzim pepsin dari lambung cakalang dan albakor diperoleh nilai aktivitas spesifik masing masing sebesar 0,3181 U/mg dan 0,124 U/mg. Perbedaan aktivitas spesifik sampel dipengaruhi oleh konsentrasi protein sampel yang dihasilkan. Konsentrasi protein sampel yang kecil dipengaruhi oleh metode ekstraksi sampel, dimana metode ekstraksi yang dilakukan menggunakan bahan baku yang masih mentah tanpa proses perubahan bahan baku menjadi powder seperti pada (Nalinanon *et al.*, 2010), sehingga jumlah konsentrasi protein yang dihasilkan lebih kecil. Aktivitas enzim pencernaan bervariasi tergantung pada spesies. Hal ini dipengaruhi oleh faktor biotik yaitu usia, ukuran, dan faktor abiotik yaitu makanan, suhu, dan parameter musim, yang dapat mengubah profil dari enzim atau mengubah aktivitas enzim (Riaz & Naeem, 2020).



Figure 1 Tuna stomach

Gambar 1 Ketampakan lambung tuna

Table 1 Tuna gastric pepsin activity

Tabel 1 Aktivitas enzim pepsin lambung tuna

Sources of raw materials	Enzyme activity (U/mL)	Protein concentration (mg/mL)	Spesific activity (U/mg)
Yellowfin (<i>Thunnus albacares</i>)	5,697.78	0.48	12,332.910
Skipjack (<i>Katsuwonus pelamis</i>) ^a	26.48	69.45	0.318
Albacore (<i>Thunnus alalunga</i>) ^b	20.58	166.48	0.124

^aNalinanon *et al.* (2010); ^bNalinanon *et al.* (2010).

Komposisi Kimia Kulit Tuna Sirip Kuning

Proses selanjutnya adalah hidrolisis kulit tuna dengan pepsin yang telah diperoleh. Sampel kulit tuna diuji untuk melihat komposisi kimia dari bahan baku kulit tuna yang digunakan. Hasil pengujian proksimat bahan baku kulit tuna disajikan dalam *Table 2*.

Hasil pengujian menunjukkan komposisi kimia paling besar terdapat pada kadar air, yang diikuti oleh kadar protein. Kadar protein sampel tuna sirip kuning yang digunakan pada penelitian ini, memiliki kadar protein yang tidak berbeda jauh pada spesies tuna yang diperoleh Suseno (2014) dan Hema *et al.* (2017). Kulit merupakan salah satu bagian dari sumber protein selain daging. Sebagian besar komponen dari kulit merupakan protein

kolagen. Kolagen adalah protein jaringan ikat yang termasuk dalam kelas protein yang menyerupai serat fibrilar atau jaringan scleroprotein. Kandungan kolagen yang tinggi pada kulit dapat diketahui melalui kandungan asam aminonya. Glisina menyusun hampir sepertiga dari struktur kolagen sedangkan sisanya merupakan asam amino yang lain (Chi *et al.*, 2014). Hasil pengujian asam amino kulit tuna disajikan pada *Table 3*.

Hasil analisis asam amino kulit tuna sirip kuning didominasi oleh glisina dengan 87.686,17 mg/kg; diikuti prolina 65.498,03 mg/kg dan alanin 27,948.33 mg/kg. Kulit yang tersusun sebagian besar atas protein kolagen, memiliki struktur kimia unik karena mengandung kadar yang sangat tinggi dari glisina, prolina, dan Hyp dalam bentuk

Table 2 Chemical composition of tuna skin

Tabel 2 Komposisi kimia kulit tuna

Sources of raw materials	Moisture (%)	Ash (%)	Protein (%)	Lipid (%)
<i>Thunnus albacares</i>	61.51	1.78	29.44	3.47
<i>Thunnus sp.</i> ^a	60.14	1.35	29.98	3.13
<i>Thunnus alalunga</i> ^b	56.54	4.39	20.54	18.32

^aSuseno (2014); ^bHema *et al.* (2013)

Table 3 Amino acid composition of tuna skin

Tabel 3 Komposisi asam amino kulit tuna

Amino acid	Content (mg/kg)
Alanine	27,948.33
Arginine	21,298.49
Aspartic acid	5,579.60
Glycine	87,686.17
Glutamic acid	21,887.94
Histidine	2,675.92
Isoleucine	1,783.91
Leucine	9,607.60
Lysine	10,436.62
Valine	3,613.30
Phenylalanine	5,999.75
Prolinae	65,498.03
Serine	7,086.44
Threonine	4,744.75
Tyrosine	1,979.76

tripeptida berulang (glisina–prolina–Y dan glisina–X–Hyp, di mana X dan Y dapat berupa asam amino apa pun). Protein kolagen mengandung 1/3 glisina, 0,7/3 prolina ditambah Hyp, dan 1,3/3 asam amino lainnya (Li & Wu, 2018).

Histologi Kulit Tuna Sirip Kuning

Berdasarkan histologi dengan pewarnaan pada kulit sebelum *pretreatment* serat kolagen berwarna merah disertai garis berwarna hitam yang merupakan lemak yang ada pada kulit. Jika dibandingkan pada kulit sebelum *pretreatment*, serat kolagen setelah proses *pretreatment* menunjukkan distribusi longgar disebabkan oleh pembengkakan yang dipicu oleh perendaman dalam larutan alkali dan penghilangan protein serta lemak non-kolagen. Hasil ini menunjukkan bahwa setelah *pretreatment*, serat kulit ikan membengkak dan zat non-kolagen terbuang, sehingga menghasilkan isolasi kolagen dengan rendemen dan kemurnian yang lebih tinggi (Xu *et al.* 2017). Konsentrasi asam asetat sangat memengaruhi hasil, titik leleh, dan mikrostruktur kolagen kulit tuna. Konsentrasi

asam asetat yang rendah, menghasilkan serat kolagen tipis dengan banyak lubang, menunjukkan jaringan yang lebih berpori dan longgar, sedangkan pada perlakuan asam asetat yang lebih tinggi, terbentuk serat tebal dan padat, menunjukkan agregat kolagen yang lebih kompak setelah perlakuan asam yang lebih tinggi (Pazeshk *et al.* 2022). Ketampakan histologi kulit sebelum dan sesudah *pretreatment* disajikan pada *Figure 2*.

Konsentrasi Protein Hidrolisat Kolagen

Hidrolisat kolagen adalah produk kaya protein yang berasal dari pemecahan kolagen asli secara enzimatik atau kimiawi, menghasilkan peptida yang lebih kecil dan mudah diserap tubuh. Konsentrasi proteinnya bervariasi tergantung pada sumber, metode pengolahan, dan tujuan penggunaan, tetapi umumnya tinggi, yang dapat dimanfaatkan untuk industri pangan, nutrasetikal, dan kosmetik.

Konsentrasi protein hidrolisat ditunjukkan pada *Figure 3*, menunjukkan perbedaan aktivitas enzim menghasilkan

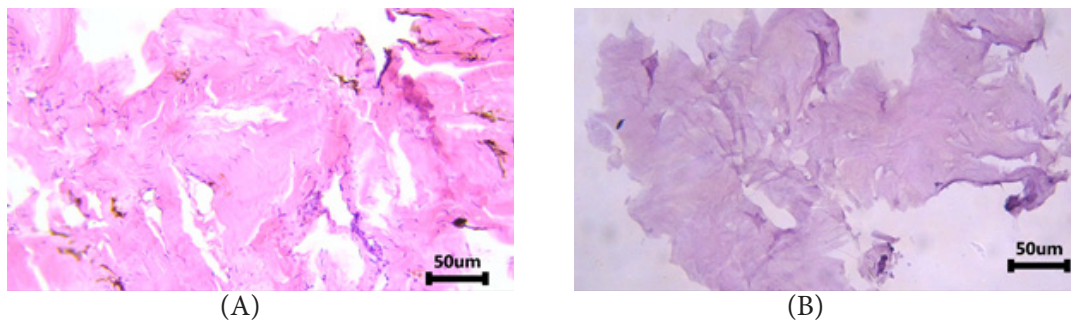


Figure 2 Tuna skin histology before (A) and (B) after pretreatment

Gambar 2 Histologi kulit tuna sebelum (A) dan sesudah (B) *pretreatment*

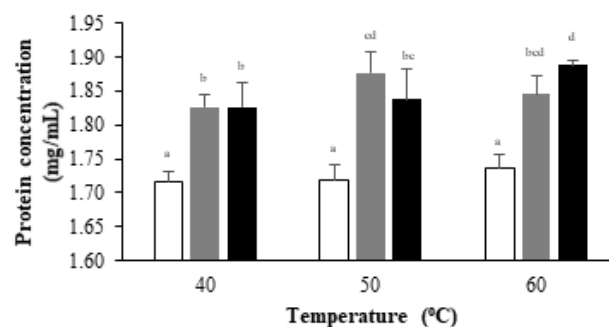


Figure 3 Protein concentration of hydrolysed collagen with different enzyme activity: (□) 6,000 U; (■) 9,000 U; (■) 12,000 U; Different superscripts indicate significant differences ($p<0.05$)

Gambar 3 Konsentrasi protein hidrolisat kolagen dengan aktivitas enzim yang berbeda: (□) 6.000 U; (■) 9.000 U; (■) 12.000 U; Superskrip yang berbeda menunjukkan perbedaan nyata ($p<0,05$)

nilai konsentrasi protein yang berbeda. Konsentrasi protein yang diperoleh pada tiap perlakuan suhu dan aktivitas enzim berkisar pada rentang 1,7-1,8 mg/mL. Sampel kulit yang dihidrolisis dengan aktivitas enzim 6.000 U memiliki nilai konsentrasi protein yang lebih kecil dibandingkan dengan perlakuan 9.000 U dan 12.000 U. Perlakuan suhu juga menghasilkan perbedaan nyata pada konsentrasi protein yang dihasilkan ($p<0,05$), namun interaksi antara aktivitas enzim dan suhu pada proses hidrolisis tidak memiliki pengaruh nyata pada konsentrasi protein yang dihasilkan ($p>0,05$). Nilai konsentrasi protein sendiri dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu bahan baku (Gaspardi *et al.*, 2022); metode hidrolisis yang digunakan mencakup jenis enzim, pH, suhu dan waktu hidrolisis (Leon-lopez *et al.*, 2019). Konsentrasi protein

dalam hidrolisat biasanya meningkat seiring dengan suhu hingga mencapai optimum spesifik enzim, kemudian menurun ketika enzim dinonaktifkan oleh panas atau protein mengalami agregasi.

Derajat Hidrolisis

Derajat hidrolisis (DH) mengukur sejauh mana ikatan peptida dalam kolagen terputus selama hidrolisis. DH yang lebih tinggi umumnya menghasilkan peptida yang lebih kecil, yang dapat meningkatkan kelarutan, aktivitas biologis, dan bioavailabilitas.

Derajat hidrolisis yang diperoleh pada tiap perlakuan hidrolisis yang ditunjukkan pada Figure 4, memiliki nilai yang beragam tiap perlakuannya. Derajat hidrolisis paling tinggi diperoleh perlakuan aktivitas enzim 9.000 U pada suhu 50°C sebesar $57,4\pm0,45\%$.

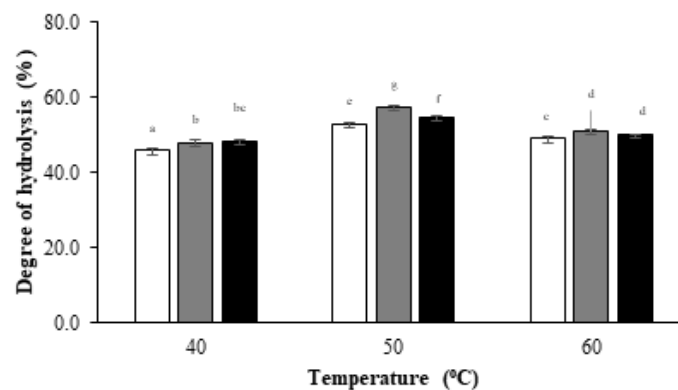


Figure 4 Degree of hydrolysis of hydrolysed collagen with different enzyme activity: (□) 6,000 U; (▒) 9,000 U; (■) 12,000 U; Different superscripts indicate significant differences ($p < 0.05$)

Gambar 4 Derajat hidrolisis hidrolisat kolagen dengan aktivitas enzim yang berbeda: (□) 6.000 U; (▒) 9.000 U; (■) 12.000 U; Superskrip yang berbeda menunjukkan perbedaan nyata ($p < 0,05$)

Perlakuan aktivitas enzim, suhu dan interaksi antara keduanya memberikan pengaruh nyata terhadap derajat hidrolisis yang dihasilkan ($p < 0,05$). Derajat hidrolisis yang dihasilkan pada penelitian ini dengan enzim pepsin memiliki nilai yang lebih besar jika dibandingkan dengan penelitian Hema *et al.* (2017) dan Ayat & Shakir (2021), masing masing memperoleh nilai derajat hidrolisis 11% dan 19%. Nilai DH yang berbeda pada penelitian dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu waktu hidrolisis, konsentrasi dan aktivitas enzim, serta suhu. Penggunaan kombinasi enzim (misalnya, kolagenase + tripsin) atau kondisi optimum (misalnya, pH dan suhu) dapat menghasilkan DH yang lebih tinggi, seringkali di atas 24–37% dalam waktu 30–90 menit, hingga 60% dengan metode enzimatis tertentu (Hema *et al.*, 2017).

Bobot Molekul

Pola elektroforesis protein hidrolisat pada SDS-PAGE diilustrasikan pada *Figure 5*. Marker Protein standar dengan rentang berat molekul (10–250 kD) digunakan untuk menentukan bobot molekul hidrolisat. Pita protein yang ditunjukkan pada hasil elektroforesis menghasilkan bobot molekul pada rentang 15–250 kDa. Pita protein yang paling mencolok dihasilkan pada bobot

molekul 20 dan 25 kDa. Hasil dalam penelitian ini bobot molekul yang dihasilkan masih banyak berada >100 kDa yang mengartikan bahwa proses hidrolisis masih belum sepenuhnya selesai selaras dengan derajat hidrolisis yang dihasilkan.

Abdollahi *et al.* (2017) melaporkan hidrolisis kolagen dengan pepsin yang diisolasi dari kulit ikan mas perak menghasilkan pita peptida dengan bobot molekul 70–15 kDa. Hidrolisis protein sangat dipengaruhi oleh jenis dan konsentrasi enzim. Aktivitas enzim serta suhu yang digunakan juga akan mempengaruhi proses hidrolisis (Kezwon *et al.*, 2016). Peptida dengan berat molekul rendah (biasanya <1–3 kDa, seringkali beberapa hingga 20 asam amino) cenderung menunjukkan bioaktivitas terkuat, karena penyerapan dan penetrasi seluler yang lebih baik. Terkadang bobot molekul menengah (misalnya 5–10 kDa) memberikan kapasitas antioksidan terbaik, sementara peptida yang lebih kecil lagi mengoptimalkan sifat pengemulsi/pengikatan lemak, menunjukkan bahwa berat molekul ideal dapat spesifik fungsi (Rivera-Jiménez *et al.*, 2022). Namun, peptida dengan berat molekul relatif besar (>10 kDa) juga dapat menunjukkan aktivitas antioksidan, antihipertensi, dan bioaktivitas lainnya.

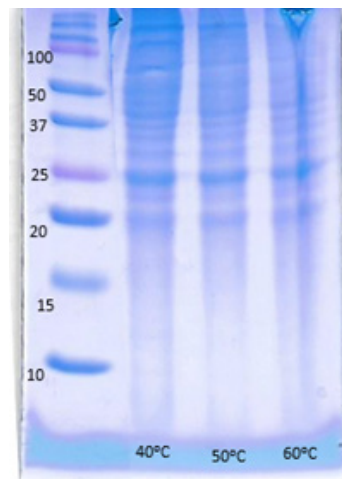


Figure 5 Molecul weight of hydrolysed collagen

Gambar 5 Bobot molekul hidrolisat kolagen

Aktivitas Antioksidan Hidrolisat Kolagen

Nilai IC_{50} yang makin kecil akan memberikan aktivitas antioksidan yang makin baik karena dibutuhkan lebih sedikit konsentrasi sampel untuk menghambat radikal bebas sebanyak 50%. Senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat saat memiliki nilai $IC_{50} < 50$ ppm, kuat bila pada rentang 50-100 ppm, sedang pada rentang 100-150 ppm, 150-200 ppm tergolong lemah dan sangat lemah apabila memiliki nilai lebih dari 200 ppm (Molyneux 2004). Nilai IC_{50} yang diperoleh berbeda tiap perlakuan sampel, nilai IC_{50} yang paling rendah diperoleh sampel dengan perlakuan 9.000 U suhu 50°C dengan nilai $59 \pm 2,49$ ppm pada ABTS dan perlakuan 9.000 U suhu 40°C dengan nilai $194 \pm 22,17$ ppm pada DPPH. Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa perbedaan aktivitas pepsin dan suhu yang diberikan selama proses hidrolisis memberikan pengaruh

nyata ($p < 0,05$) terhadap aktivitas antioksidan hidrolisat kolagen kulit tuna (Table 4).

Nurilmala *et al.* (2020) menggunakan sampel kulit tuna sirip kuning memperoleh nilai yang IC_{50} sebesar $66,28 \pm 0,12$ $\mu\text{g/mL}$ untuk ABTS dan $119,10 \pm 0,01$ $\mu\text{g/mL}$ untuk DPPH. Selanjutnya Kusumaningtyas *et al.* (2019) melaporkan kemampuan hidrolisat dalam mereduksi oksidator ABTS (>80%) lebih baik dibandingkan oksidator DPPH (5,79%) pada konsentrasi 1 mg/mL protein hidrolisat. Uji ABTS maupun DPPH secara konsisten menunjukkan bahwa kolagen kulit ikan yang dihidrolisis menunjukkan aktivitas antioksidan yang signifikan, meskipun hasilnya dapat bervariasi berdasarkan spesies, enzim yang digunakan, dan ukuran peptida. Umumnya, hidrolisis meningkatkan kapasitas antioksidan, peptida dengan berat molekul lebih rendah (<3–10 kDa) menunjukkan aktivitas tertinggi pada kedua uji tersebut. ABTS seringkali mendeteksi aktivitas

Table 4 Antioxidant activity of hydrolysed collagen

Tabel 4 Aktivitas antioksidan hidrolisat kolagen

Enzyme activity (U)	40°C		50°C		60°C	
	DPPH	ABTS	DPPH	ABTS	DPPH	ABTS
6,000	232 ± 4.56^b	117 ± 4.55^b	586 ± 29.44^e	109 ± 7.88^b	732 ± 23.84^g	170 ± 6.56^c
9,000	194 ± 22.17^a	165 ± 1.47^c	361 ± 12.84^c	59 ± 2.49^a	687 ± 14.74^f	157 ± 3.04^c
12,000	531 ± 6.37^d	257 ± 1.70^e	599 ± 21.21^e	230 ± 2.89^d	937 ± 34.12^h	325 ± 16.59^f

antioksidan yang lebih tinggi daripada DPPH, kemungkinan karena kemampuannya untuk mengukur senyawa hidrofilik dan lipofilik, sementara DPPH lebih cocok untuk antioksidan hidrofobik (Rumpf *et al.*, 2023). Kapasitas antioksidan meningkat seiring dengan berlangsungnya hidrolisis hingga mencapai titik optimum, tetapi hidrolisis lebih lanjut atau hanya menggunakan kondisi yang “lebih aktif” dapat mengurangi atau mencapai titik jenuh aktivitas. Efek antioksidan bergantung pada struktur dan ukuran peptida, bukan hanya dari aktivitas enzim yang digunakan (Mahdavi-Yekta *et al.*, 2019).

Inhibitor ACE

Angiotensin converting enzyme (ACE) memainkan peranan penting dalam regulasi tekanan darah. ACE mengkonversi angiotensin I menjadi vasokonstriktor kuat angiotensin II. Semakin tinggi aktivitas inhibitor ACE maka semakin rendah konsentrasi asam hipurat yang terbentuk (Ahmad *et al.* 2017). Konsentrasi sampel yang digunakan sebesar 1,7 mg/mL protein dalam pengujian ini. Hasil pengujian aktivitas ACE inhibitor disajikan pada *Figure 6*.

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa perbedaan aktivitas pepsin dan suhu hidrolisis yang digunakan memberikan pengaruh yang nyata ($p < 0,05$) terhadap aktivitas penghambatan ACE (*Figure 6*). Hasil inhibisi yang paling baik ditunjukkan pada perlakuan enzim 9.000 U pada suhu

50°C, dimana hasil aktivitas inhibitor ACE $66 \pm 0,93\%$, pada konsentrasi 1,7 mg/mL protein. Hidrolisat kolagen dari teripang yang dilaporkan oleh Khirzin *et al.* (2015), memperoleh aktivitas inhibitor ACE sebesar 82,31% dengan perlakuan hidrolisis 180 menit pada konsentrasi 15 mg/mL. Hasil penelitian yang diperoleh menghasilkan nilai yang cukup tinggi karena konsentrasi yang diperlukan untuk mencapai nilai IC_{50} lebih sedikit jika dibandingkan dengan penelitian Khirzin *et al.* (2015). Penggunaan jenis enzim yang berbeda juga akan menghasilkan peptida bioaktif serta kemampuan inhibisi yang berbeda pula. Hidrolisat kolagen dari gelembung renang *monkfish* yang dilaporkan oleh Hu *et al.* (2023), memperoleh aktivitas inhibitor ACE sebesar $53,22 \pm 2,63\%$ dengan hidrolisis enzimatis alkalase + neutrase pada konsentrasi 2,5 mg/mL. Alkalase adalah protease basa yang sering digunakan untuk pembangkitan peptida bioaktif dengan aktivitas penghambatan ACE.

KESIMPULAN

Aktivitas pepsin dan suhu hidrolisis memberikan pengaruh nyata terhadap aktivitas antioksidan dan inhibitor ACE. Perlakuan aktivitas enzim 9.000 U dengan suhu hidrolisis 50°C, menghasilkan produk hidrolisat dengan kemampuan inhibisi paling baik. Bobot molekul yang masih cenderung tinggi dapat dilakukan hidrolisis bertingkat untuk menghasilkan hidrolisat dengan bobot molekul yang lebih rendah.

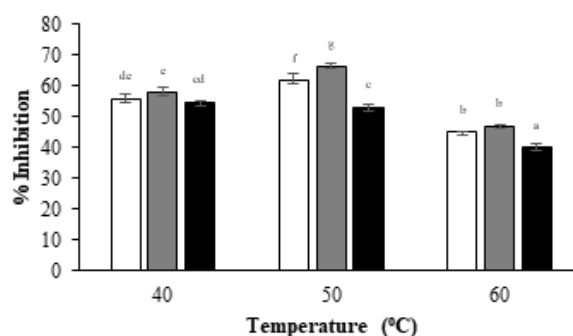


Figure 6 ACE inhibitor activity of hydrolysed collagen with different enzyme activity: (□) 6,000 U; (■) 9,000 U; (■) 12,000 U; Different superscripts indicate significant differences ($p < 0,05$)

Gambar 6 ACE inhibitor hidrolisat kolagen dengan aktivitas enzim yang berbeda: (□) 6.000 U; 6.000 U; (■) 9.000 U; (■) 12.000 U; Superskrip yang berbeda menunjukkan perbedaan nyata ($p < 0,05$)



UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Kementerian Pendidikan Tinggi, Sains, dan Teknologi Republik Indonesia melalui pendanaan Program Riset Keilmuan skema Hibah PPS-PTM dengan nomor kontrak: 006/C3/DT.05.00/PL/2025 pada tanggal 28 Mei 2025 atas nama Prof Dr Tati Nurhayati S. Pi., M. Si.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah A., Nurhayati T., Nugroho F. A. (2022). Antioxidant activity of trypsin and pepsin-hydrolyzed fish collagen. *In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 1033(1): 012066. IOP Publishing. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1033/1/012066>
- Angka, S.L., Mokoginta, I.S., Hamid H. (1990). Anatomi dan Histologi beberapa Ikan Air Tawar yang Dibudidayakan di Indonesia. Pusat Antar Universitas Ilmu Hayat IPB.
- Arihara K., Nakashima Y., Mukai T., Ishikawa S., Itoh M. (2001). Peptide inhibitor for angiotensin i - converting enzyme from enzymatic hydrolysates of porcine skeletal muscle proteins. *Meat Science*, 57, 319-324. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(00\)00108-X](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(00)00108-X)
- Ayat A. A., Shakir K. A. (2021). Functional properties of catfish skin collagen hydrolysates. *Iraqi Journal of Agricultural Sciences*, 52(6), 1528-1540. <https://doi.org/10.36103/ijas.v52i6.1494>
- Baehaki A., Lestari S., Romadhoni A. (2015). Hidrolisis protein ikan patin menggunakan enzim papain dan aktivitas antioksidan hidrolisatnya. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 18(3), 230–239. <https://doi.org/10.17844/jphpi.2015.18.3.230>
- Baehaki A., Suhartono M. T., Sukarno., Syah D., Setyahadi S. (2016). Collagen peptides from fish skin with angiotensin i-converting enzyme (ACE) inhibitor and cancer antiproliferative activity. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 7(1), 1994-2000.
- Benhabiles M. S., Abdi N., Drouiche, N., Lounici, H., Pauss A., Goosen M. F. A., Mameri N. (2012). Fish protein hydrolysate production from sardine solid waste by crude pepsin enzymatic hydrolysis in a bioreactor coupled to an ultrafiltration unit. *Materials Science and Engineering, C*. 32(4), 922–928. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.02.013>
- Benjakul S., Karnjanapratum S., Visessanguan W. (2017). Production and characterization of odorless antioxidative hydrolyzed collagen from seabass (*Lates calcarifer*) skin without descaling. *Waste and Biomass Valorization*, 9(4), 549–559. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-0008-9>
- Bougatef A., Balti R., Zaeid S. B., Souissi N., Nasri M. (2008). Pepsinogen and pepsin from the stomach of smooth hound (*Mustelus mustelus*): Purification., characterization., and amino acid terminal sequences. *Food Chemistry*, 107, 777-784. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.077>
- Cai S., Pan N., Xu M., Su Y., Qiao K., Chen B., Zheng B., Xiao M., Liu Z. (2021). ACE inhibitory peptide from skin collagen hydrolysate of *Takifugu bimaculatus* as potential for protecting HUVECs injury. *Marine Drugs*, 19(12), 655. <https://doi.org/10.3390/md19120655>
- Cai W. W., Hu X. M., Wang Y. M., Chi C. F., Wang B. (2022). Bioactive peptides from skipjack tuna cardiac arterial bulbs: preparation, identification, antioxidant activity, and stability against thermal, pH, and simulated gastrointestinal digestion treatments. *Marine Drugs*, 20(10), 626. <https://doi.org/10.3390/md20100626>
- Chi C. F., Cao Z. H., Wang B., Hu F. Y., Li Z. R., Zhang B. (2014). Antioxidant and functional properties of collagen hydrolysates from spanish mackerel skin as influenced by average molecular weight. *Molecules*, 19(8), 11211-11230. <https://doi.org/10.3390/molecules190811211>
- Dunn B. (2006). Quantitative Amino Acid Analysis. *Current Protocols in Molecular Biology*, 76, 10.1.11-10.1.13. <https://doi.org/10.1002/0471142709.ch10.1.11>

- org/10.1002/0471140864
- [FAO] Food and Agriculture Organization. By-products of tuna processing. GLOBEFISH Research Programme. 112(12): 1-48. Roma: FAO.
- Hema G. S., Shyni K., Mathew S., Ananda R., Ninan G., Lakshmanan P. T. (2013). A simple method for isolation of fish skin collagen-biochemical characterization of skin collagen extracted from albacore tuna (*Thunnus alalunga*), dog shark (*Scoliodon sorrakowah*), and rohu (*Labeo rohita*). *Annals of Biological Research*, 4(1), 271-278.
- Hema G. S., Joshy C. G., Shyni K., Chatterjee N. S., Ninan G., Mathew S. (2017). Optimization of process parameters for the production of collagen peptides from fish skin (*Epinephelus malabaricus*) using response surface methodology and its characterization. *J Food Sci Technol*, 54, 488-496. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2490-2>
- Hu Y. D., Xi Q. H., Kong J., Zhao Y. Q., Chi C. F., Wang B. (2023). Angiotensin-i-converting enzyme (ACE)-inhibitory peptides from the collagens of monkfish (*lophius litulon*) swim bladders, isolation., characterization., molecular docking analysis and activity evaluation. *Marine Drugs*, 21(10), 516. <https://doi.org/10.3390/md21100516>
- Jurado E., Vicaria J. M., Lechuga M., Moya-Ramirez I. (2012). Pepsin extraction process from swine wastes. *Procedia Engineering*, 42, 1346-1350. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2012.07.526>
- Khirzin M. H., Sukarno., Yuliana N. D., Fawzya Y. N., Chasanah E. (2015). Aktivitas inhibitor enzim pengubah angiotensin (ACE) dan antioksidan peptida kolagen dari teripang gamma (*Stichopus variegatus*). *JPB Kelautan dan Perikanan*, 10(1), 27-35. <https://doi.org/10.15578/jpbkp.v10i1.242>.
- [KKP] Kementerian Kelautan dan Perikanan. (2020). Peluang usaha dan investasi tuna. Jakarta (ID), Kementerian Kelautan dan Perikanan.
- Kurniawan R., Izzati S. A. N., Nurhayati T., Jacob A. M. (2024). Application of pepsin enzyme from yellowfin tuna gastrics on the physical and histological characteristics of beef. In *BIO Web of Conferences* 147(1), 01026. EDP Sciences. <https://doi.org/10.1051/bioconf/202414701026>
- Li H., Cheng K., Wong C., Fan K., Chen F., Jiang Y. (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry*, 102(3), 771-776. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.022>
- Li P., & Wu G. (2018). Roles of dietary glycine., proline., and hydroxyproline in collagen synthesis and animal growth. *Amino Acids*, 50, 29-38. <https://doi.org/10.1007/s00726-017-2490-6>
- Ma X., Chuang P. H., Tseng Y. H., Wang X., Ma Z., Chen H., Zhai W., Yang W., Meng Z., Xu J. 2025. Progress in research on animal collagen peptides: preparation., bioactivity., and application. *Molecules*, 30(15), 3061. <https://doi.org/10.3390/molecules30153061>
- Mahdavi-Yekta M., Nouri L., Azizi M. (2019). The effects of hydrolysis condition on antioxidant activity of protein hydrolyzate from quinoa. *Food Science & Nutrition*, 7, 930-936. <https://doi.org/10.1002/fsn.3.871>
- Nalinanon S., Benjakul S., Kishimura H. (2010). Biochemical properties of pepsinogen and pepsin from the stomach of albacore tuna (*Thunnus alalunga*). *Food Chemistry*, 121, 49-55. [10.1016/j.foodchem.2009.11.089](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.11.089)
- Nalinanon S., Benjakul S., Kishimura H. (2010). Collagens from the skin of arabesque greenling (*Pleurogrammus azonus*) solubilized with the aid of acetic acid and pepsin from albacore tuna (*Thunnus alalunga*) stomach. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(9), 1492-1500. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3973>
- Nalinanon S., Benjakul S., Kishimura H. (2010). Purification and biochemical properties of pepsins from the stomach of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*).



- Eur Food Res Technol*, 231, 259–269. <https://doi.org/10.1007/s00217-010-1275-x>
- Nurhayati T., Uju., Simangunsong J. S. U. (2022). Karakterisasi pepsin lambung ikan tuna sirip kuning (*Thunnus albacares*) yang dikeringkan dengan metode berbeda. *JPHPI*, 25(1), 163-175. <http://dx.doi.org/10.17844/jphpi.v25i1.38427>
- Nurhayati T., Ambarsari L., Nurilmala M., Abdullah A., Rakhmawati IAI., Yuniasih. (2020). Pepsin activity from gastric of milkfish and catfish in Indonesian Waters. In *IOP Conference Series, Earth and Environmental Science* 404(1), 012060. IOP Publishing. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/404/1/012060>
- Nurhayati T., Trilaksani W., Ramadhan W. (2022). The Role of Pepsin in Improving the Quality of Surimi of Red Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Current Research in Nutrition and Food Science*, 10(2), 584-594. <http://dx.doi.org/10.12944/CRNFSJ.10.2.15>
- Nurhayati T., Wirayudha R. H., Suptijah P. (2023). Karakteristik pepton dari limbah jeroan ikan sidat (*Anguilla bicolor*) sebagai nutrisi untuk pertumbuhan bakteri. *JPHPI*, 26(1), 1-12. <http://dx.doi.org/10.17844/jphpi.v26i1.43326>
- Nurilmala M., Hizbullah H. H., Karnia E., Kusumaningtyas E., Ochiai Y. (2020). Characterization and Antioxidant Activity of Collagen., Gelatin., and the Derived Peptides from Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*) Skin. *Marine Drugs*, 18(2), 98. <https://doi.org/10.3390/md18020098>
- Nurjanah., Baharrudin T. I., Nurhayati T. (2021). Ekstraksi kolagen kulit ikan tuna sirip kuning (*Thunnus albacares*) menggunakan enzim pepsin dan papain. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 24(2), 174-187. <http://dx.doi.org/10.17844/jphpi.v24i2.35410>
- Oztug M. 2024. Bioactive peptide profiling in collagen hydrolysates, comparative analysis using targeted and untargeted liquid chromatography–tandem mass spectrometry quantification. *Molecules*, 29(11), 2592. <https://doi.org/10.3390/molecules29112592>
- Pasaribu E., Nurhayati T., Nurilamala M. (2018). Ekstraksi dan karakterisasi enzim pepsin dari lambung ikan tuna (*Thunnus albacares*). *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 21(3), 486-496.
- Patil U., Saetang J., Zhang B., Benjakul S. (2023). Use of tuna visceral pepsin in combination with trypsin as digestion aid, enhanced protein hydrolysis and bioavailability. *Foods*, 12(1), 125. <https://doi.org/10.3390/foods12010125>
- Pezeshk, S., Rezaei, M., Abdollahi, M. (2022). Impact of ultrasound on extractability of native collagen from tuna by-product and its ultrastructure and physicochemical attributes. *Ultrasonics Sonochemistry*, 89, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2022.106129>
- Putalan R., Munifah I., Nurhayati T., Chasanah E. (2018). Antioxidant and ace inhibitor potential of stripe trevally fish (*Selaroides leptolepis*) hydrolysate. *Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology*, 13(1), 17-22. DOI: <http://dx.doi.org/10.15578/squalen.v13i1.319>
- Putalan R., Nurhayati T., Chasanah E. (2020). Fraksinasi peptida dari hidrolisat protein ikan selar (*Selaroides leptolepis*). *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 23(3), 434-440.
- Riaz P., & Naeem M. (2020). Digestive enzymes activity with gut morphometric parameter of carnivorous fish Wallago attu (*Siluridae siluriformes*). *Sarhad Journal of Agriculture*. 36(3), 832-839. <http://dx.doi.org/10.17582/journal.sja/2020/36.3.832.839>
- Rivera-Jimenez J., Berraquero-García C., Pérez-Gálvez R., García-Moreno P., Espejo-Carpio F., Guadix, A., Guadix E. (2022). Peptides and protein hydrolysates exhibiting anti-inflammatory activity, sources., structural features and modulation mechanisms. *Food & function*, 13, 12510–12540. <https://doi.org/10.1039/d2fo02223k>
- Rizzello C. G., Tagliazucchi D., Babini E., Rutella G. S., Saa D. L. T., Gianotti A.

- (2016). Bioactive peptides from vegetable food matrices, Research trends and novel biotechnologies for synthesis and recovery. *J. Funct. Foods*, 27, 549–569. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.09.023>
- Saputra D., & Nurhayati T. (2013). Produksi dan aplikasi pepton ikan selar untuk media pertumbuhan bakteri. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 16(3), 215–223.
- Sholeh M. M., Ambarsari L., Nurcholis W., Nurhayati T. (2020). Characterization of ammonium sulphate fraction of pepsin from fish stomach. In *IOP Conference Series, Earth and Environmental Science* 404(1), 012060. IOP Publishing. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/404/1/012039>
- Suseno S. H. (2014). Proximate., fatty acid., amino acid and mineral composition of tuna (*Thunnus* sp.) By-product from West Sumatra Province, Indonesia. *Pakistan Journal of Nutrition*, 14(1), 62–66. <https://doi.org/10.3923/pjn.2015.62.66>
- Thamnarathip P., Jangchud K., Nitisinprasert S., Vardhanabhuti B. (2016). Identification of peptide molecular weight from rice bran protein hydrolysate with high antioxidant activity. *Journal of Cereal Science*, 69, 329–335. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2016.04.011>
- Viji P., Phannendra TS., Jesmi D., Madhusudana Rao B., Dhiju Das PH., George N. 2019. Functional and antioxidant properties of gelatin hydrolysates prepared from skin and scale of sole fish. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 28(10), 976–986. <https://doi.org/10.1080/10498850.2019.1672845>
- Xu, S., Yang, H., Shen, L., Li, G. (2017). Purity and yield of collagen extracted from southern catfish (*Silurus meridionalis* Chen) skin through improved pretreatment methods. *International Journal of Food Properties*, 20(1), S141–S153. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1291677>