

STUDI LITERATUR PENGARUH ENZIM PROTEASE (PAPAIN, BROMELIN DAN PROTEASE BIDURI) TERHADAP KADAR PROTEIN PADA IKAN LAUT MENGGUNAKAN METODE SPEKTROFOTOMETRI DAN KJEDAL

Anik Eko Novitasari, , Fita Dwi Andriani^{2*)}

^{*)}Akademi Analis Kesehatan Delima Husada Gresik

ABSTRACT

Protease was a type of protein hydrolyzing enzyme that has high economic value because of its application, namely protein hydrolyzate. There were several protease enzymes used to hydrolyze protein in marine fish, namely papain, bromelin and biduri proteases. The aim of this study was to determine the effect of the protease enzyme from several different sources such as the papain enzyme, bromelin enzyme and biduri protease enzymes as protein hydrolysis enzymes in marine fish.

This review literature research uses samples of several types of marine fish. The protein contained in fish was a dissolved protein which is very important in the hydrolyzate product.

The results showed that protease enzymes including papain, bromelin and biduri proteases could be used as protein hydrolyzing enzymes. The process of protein hydrolysis in marine fish with protease enzymes can increase protein levels along with increasing enzyme concentrations.

Keywords : *Protease enzymes, Papain, Bromelin, Biduri, Fish protein hydrolyzate*

PENDAHULUAN

Protease merupakan jenis enzim penghidrolisis protein yang memiliki nilai ekonomis tinggi karena aplikasinya yang luas. Salah satu aplikasi protease yaitu pada industri pangan, seperti pengempuk daging, hidrolisat protein, pembuatan keju, dan sebagainya. Produksi protease dapat diperoleh dari makhluk hidup, meliputi mikroorganisme, hewan, dan tanaman (Hardi & Diharnaini, 2014). Tanaman dapat dijadikan sebagai salah satu alternatif penghasil enzim protease antara lain enzim papain dari getah tanaman pepaya dan enzim bromelin yang diisolasi dari batang atau sari buah nanas (Sari, 2015). Selain itu, tanaman yang memiliki potensi untuk dieksplorasi secara optimal sebagai

sumber enzim protease adalah tanaman biduri (Hardi & Diharnaini, 2014).

Papain merupakan enzim protease yang diisolasi dari getah tanaman pepaya (*Carica papaya*) yang banyak digunakan secara komersial dan tersedia dipasaran, salah satunya sebagai pengempuk daging (Harahap, 2018). Papain memiliki sifat kestabilan yang relatif tinggi terhadap faktor suhu dan pH. Kestabilan enzim papain baik sekali pada larutan yang mempunyai pH 5,0. pH optimal untuk substrat albumin maupun kasein adalah 7,0 dan untuk substrat gelatin 5,0. Papain mempunyai daya tahan panas lebih tinggi dibanding enzim lain (Rosdianti, 2008).

Bromelin merupakan enzim protease yang diisolasi dari buah, kulit, bonggol, tangkai dan daun nanas

(*Ananas comosus*) (Sulastrri, 2010). Enzim bromelin merupakan salah satu jenis enzim protease yang mampu menghidrolisis ikatan peptida pada protein atau polipeptida menjadi molekul yang lebih kecil yaitu asam amino (Permatasari, dkk., 2017). Enzim ini aktif pada pH 6,5 atau dalam kisaran pH 6-8. Suhu optimum enzim bromelin adalah 50°C, namun pada kisaran 30-60°C enzim masih bekerja dengan baik (Sulastrri, 2010).

Protease biduri merupakan sumber enzim protease yang dapat dihasilkan dari ekstrak tanaman biduri (*Calotropis gigantea*) baik getah, batang maupun daun (Witono & Kang, 2010). Enzim protease biduri dapat melakukan aktivitasnya dengan optimal pada suhu 55°C dan pH 7 (Susanti, 2005). Enzim protease biduri termasuk dalam golongan eksopeptidase yang sesuai untuk aplikasi dalam pembuatan hidrolisat protein flavor enhancer (Witono & Kang, 2010).

Ikan sebagai salah satu bahan pangan merupakan sumber protein hewani yang tinggi. Protein merupakan komponen gizi terbesar yang terdapat dalam daging ikan yaitu sekitar 30-80%, sehingga ikan merupakan sumber protein hewani yang potensial (Witono, dkk., 2014). Pada ikan baji-baji dan ikan bibisan memiliki kandungan protein sebesar 17,86% dan 18,26% (Wahyuningtyas, 2018). Pada cumi-cumi memiliki kandungan protein sebesar 17,9 gram/100 gram cumi segar. Selain itu, pada tinta cumi-cumi juga memiliki kandungan protein yang cukup tinggi yaitu 10,88% (Permatasari, dkk., 2017).

Hidrolisat protein merupakan produk yang dihasilkan dari penguraian protein menjadi peptida sederhana dan asam amino melalui proses hidrolisis oleh enzim proteolitik, asam atau basa. Hidrolisis protein menggunakan enzim merupakan cara yang efisien karena dapat menghasilkan hidrolisat protein yang terhindar dari kerusakan asam amino tertentu, seperti triptofan dan glutamin (Kristinsson, 2007).

Penggunaan enzim dalam menghidrolisis protein dianggap paling aman dan menguntungkan. Hal ini disebabkan kemampuan enzim dalam menghidrolisis protein dapat menghasilkan produk hidrolisat yang terhindar dari perubahan dan kerusakan produk (Kurniawan, dkk., 2012).

Hidrolisat protein dapat dimanfaatkan sebagai penyedap rasa, suplemen diet bagi atlet maupun orang-orang yang ingin membentuk otot tubuhnya, sebagai menu bagi penderita gangguan pencernaan, bahan tambahan makanan serta sebagai sediaan asam amino untuk memenuhi kebutuhan industri, pangan, dan kesehatan (Rosdianti, 2008). Hidrolisat protein ikan memiliki indikasi untuk menurunkan tekanan darah tinggi, mengurangi stress serta membantu penyembuhan pasien yang menderita gangguan pada sistem pencernaan (Kristinsson, 2007).

Berbagai penelitian hidrolisis protein secara enzimatis telah banyak dikembangkan. Penelitian hidrolisis cumi-cumi dilakukan dengan menggunakan enzim bromelin dan papain (Gokoglu, dkk., 2016). Pada proses hidrolisis protein ikan patin menggunakan penambahan enzim papain (Baehaki, dkk., 2015). Pada produksi hidrolisat protein ikan menggunakan enzim papain (Koesoemawardani, dkk., 2011). Pada proses hidrolisis protein tinta cumi juga menggunakan enzim papain (Kurniawan, dkk., 2012). Pada produksi hidrolisat protein tinta cumi-cumi kering menggunakan enzim bromelin (Permatasari, dkk., 2017). Pada produksi flavor udang windu menggunakan enzim protease biduri (Hardi & Diharnaini, 2014). Selain itu, hidrolisis ikan bernilai ekonomi rendah juga menggunakan enzim protease biduri (Witono, dkk., 2014).

Berdasarkan uraian di atas maka timbul suatu permasalahan yaitu apakah enzim protease dari beberapa sumber yang berbeda seperti enzim papain, enzim bromelin dan enzim protease

biduri dapat digunakan sebagai enzim penghidrolisis protein pada ikan laut ?

Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui pengaruh enzim protease dari beberapa sumber yang berbeda seperti enzim papain, enzim bromelin dan enzim protease biduri sebagai enzim penghidrolisis protein pada ikan laut.

Penelitian literatur review ini diharapkan dapat memberikan informasi dalam perkembangan ilmu pengetahuan bahwa enzim protease diantaranya enzim papain, enzim bromelin dan enzim protease biduri dapat digunakan sebagai enzim penghidrolisis protein dan dapat meningkatkan kadar protein terlarut pada berbagai bahan pangan khususnya pada produk ikan.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian *literatur review* dengan menganalisis pengaruh penambahan enzim protease terhadap kadar protein pada ikan laut menggunakan metode spektrofotometri dan kjedal. Penelitian ini dilakukan menggunakan rancangan penelitian deskriptif secara analisis kualitatif. Parameter yang diamati adalah kadar protein yang terdapat pada ikan patin, ikan rucah, cumi-cumi, udang windu, tinta cumi-cumi dan ikan bernilai ekonomi rendah (bibisan, baji-baji dan lidah) setelah dilakukan penambahan enzim protease seperti enzim papain, enzim bromelin dan protease biduri. Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari sampai dengan bulan Juli 2020.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari hasil studi literatur yang telah dilakukan pada penambahan enzim protease (papain, bromelin dan protease biduri) terhadap kadar protein pada ikan laut dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Pengaruh Penambahan Enzim Protease Terhadap Kadar Protein Pada Ikan Laut

No.	Sumber enzim	Sampel ikan	Hasil Kadar Protein	
			Sebelum	Sesudah
1.	Enzim papain dan enzim bromelin	Cumi-cumi	Papain: 23 µg/ml Bromelin: 25 µg/ml	Papain: 50 µg/ml Bromelin: 41 µg/ml
2.	Enzim papain	Ikan patin	20 mg/ml	54 mg/ml
3.	Enzim papain	Ikan rucah	-	2,2 %
4.	Enzim papain	Tinta cumi-cumi	28,90 mg/ml	36,31 mg/ml
5.	Enzim bromelin	Tinta cumi-cumi	5,13 %	10,97 %
6.	Enzim protease biduri	Udang windu	-	71,65 %
7.	Enzim protease biduri	Ikan bibisan, baji-baji dan lidah	2,2 %	3,5 %

Pengaruh Enzim Terhadap Kadar Protein

Pada penelitian review ini membahas tentang pengaruh penambahan enzim protease terhadap kadar protein pada ikan laut. Enzim protease dapat diperoleh dari makhluk hidup, meliputi mikroorganisme, hewan, dan tanaman. Meskipun mikroba dikenal luas sebagai sumber enzim protease, namun untuk tujuan-tujuan tertentu enzim protease dari tanaman masih mempunyai peranan yang sangat besar yang belum sepenuhnya dapat digantikan oleh enzim mikroba. Enzim yang diproduksi dari jaringan hewan relatif mahal dan ketersediaannya tergantung pada permintaan hewan-hewan sumber enzim tersebut di pasaran, mengingat enzim harus diekstrak dari hewan-hewan yang sudah mati (Witono, dkk., 2006). Enzim yang digunakan bersumber dari tanaman diantaranya papain, bromelin maupun

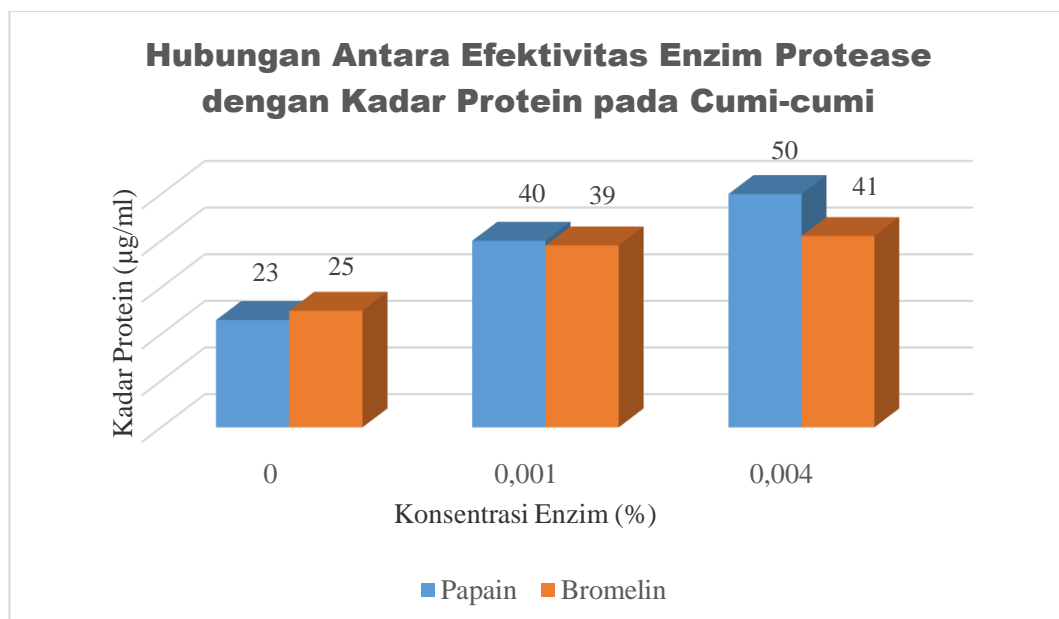
protease biduri sebagai enzim penghidrolisis protein pada ikan laut.

Ikan merupakan sumber protein hewani yang tinggi. Protein yang terkandung dalam ikan merupakan protein terlarut yang sangat penting dalam produk hidrolisat. Ikan merupakan bahan pangan yang mudah rusak dan busuk. Agar ikan dan hasil perikanan lainnya dapat dimanfaatkan semaksimal mungkin, maka perlu dijaga kondisinya (Adawiyah, 2007). Pengolahan ikan menjadi hidrolisat protein bertujuan untuk mengatasi kerusakan ikan dan mendapatkan bahan pangan yang lebih mudah dicerna oleh tubuh karena proteinnya telah terurai menjadi asam amino dan peptida yang lebih sederhana (Haslina, dkk., 2006).

Pada proses hidrolisis protein ada 3 cara yaitu hidrolisis dengan asam, basa dan enzim protease. Menurut Kurniawan dkk., (2012) penggunaan enzim dalam menghidrolisis protein dianggap paling aman dan menguntungkan. Alternatif hidrolisis secara enzimatik dipandang lebih efisien dibandingkan secara kimiawi, karena hidrolisis secara enzimatik menghasilkan asam-asam amino bebas dan peptida

dengan rantai pendek yang bervariasi. Hal ini akan lebih menguntungkan karena memungkinkan untuk memproduksi hidrolisat dengan flavor yang berbeda (Mujiyanto, dkk., 2015).

Penelitian yang dilakukan Gokoglu, dkk., (2016) menggunakan enzim papain dan bromelin pada cumi-cumi terbukti adanya peningkatan kadar protein terlarut yang signifikan seiring bertambahnya konsentrasi enzim. Ada perbedaan kadar protein yang dihasilkan antara tanpa penambahan enzim dengan penambahan enzim pada berbagai konsentrasi (Gambar 1). Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar protein terlarut tertinggi diperoleh pada perlakuan enzim papain 0,004 %, dimana hasil penggunaan enzim papain lebih baik dari enzim bromelin. Hal ini dikarenakan enzim papain memiliki kemampuan menghidrolisis protein lebih baik dari enzim bromelin. Selain itu enzim papain memiliki sifat kestabilan yang relatif tinggi terhadap faktor suhu dan pH. pH optimum enzim papain adalah 7 sedangkan pH optimum enzim bromelin adalah 6.



Gambar 1. Grafik Hubungan Efektivitas Enzim Protease dengan Kadar Protein Pada Cumi-cumi

Penelitian yang dilakukan Hardi & Dihnarnaini, (2014) menggunakan enzim protease dari getah biduri pada produksi flavor udang windu. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar protein terlarut terendah pada kombinasi konsentrasi biduri 1,5% dengan lama hidrolisis 0 jam dan kadar protein terlarut tertinggi pada kombinasi konsentrasi biduri 2,5 % dengan lama hidrolisis 2 jam. Selain menggunakan variasi konsentrasi juga menggunakan variasi waktu. Semakin lama waktu hidrolisis maka semakin banyak protein terlarut. Waktu hidrolisis yang lama mengakibatkan interaksi antara substrat dengan enzim semakin lama sehingga semakin meningkatkan jumlah protein sederhana yang sangat mudah untuk larut. Adapun kadar protein pada udang windu dapat dilihat pada Gambar 2. Namun pada penelitian yang dilakukan Witono, dkk., (2014) menunjukkan bahwa kadar protein tertinggi pada ikan bernilai ekonomi rendah yaitu pada penggunaan enzim dengan konsentrasi protease biduri sebesar 2,1 Unit/g dan waktu hidrolisis 1,5 jam yaitu sebesar 3,5 %

Penelitian yang dilakukan Koesoemawardani, dkk., (2011) menggunakan enzim papain pada proses pembuatan hidrolisat protein ikan rucah. Berdasarkan Gambar 2 kadar protein terlarut hidrolisat protein ikan rucah tertinggi terdapat pada perlakuan enzim papain 7% dengan pH 6,5 yaitu sebesar 2,2 %. Pada penelitian ini disamping ada variasi konsentrasi enzim juga ada perbedaan variasi pH. Pada pH yang terlalu tinggi atau terlalu rendah enzim akan mengalami denaturasi (Kusmiyati, 2017). Namun pada penelitian yang dilakukan Baehaki, dkk., (2015) menunjukkan bahwa kadar protein ikan patin tertinggi pada konsentrasi enzim papain 6%. Penambahan konsentrasi enzim papain menyebabkan protein meningkat. Hal ini disebabkan karena enzim itu sendiri adalah protein.

Penelitian yang dilakukan Kurniawan, dkk., (2012) juga terjadi peningkatan kadar protein yang

signifikan seiring penambahan konsentrasi enzim papain pada tinta cumi-cumi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar protein terendah terdapat pada kontrol (tanpa penambahan enzim bromelin) dan tertinggi terdapat pada penambahan enzim 6%. Perbedaan kadar protein tinta cumi-cumi yang dihasilkan karena pengaruh penambahan konsentrasi enzim yang digunakan.

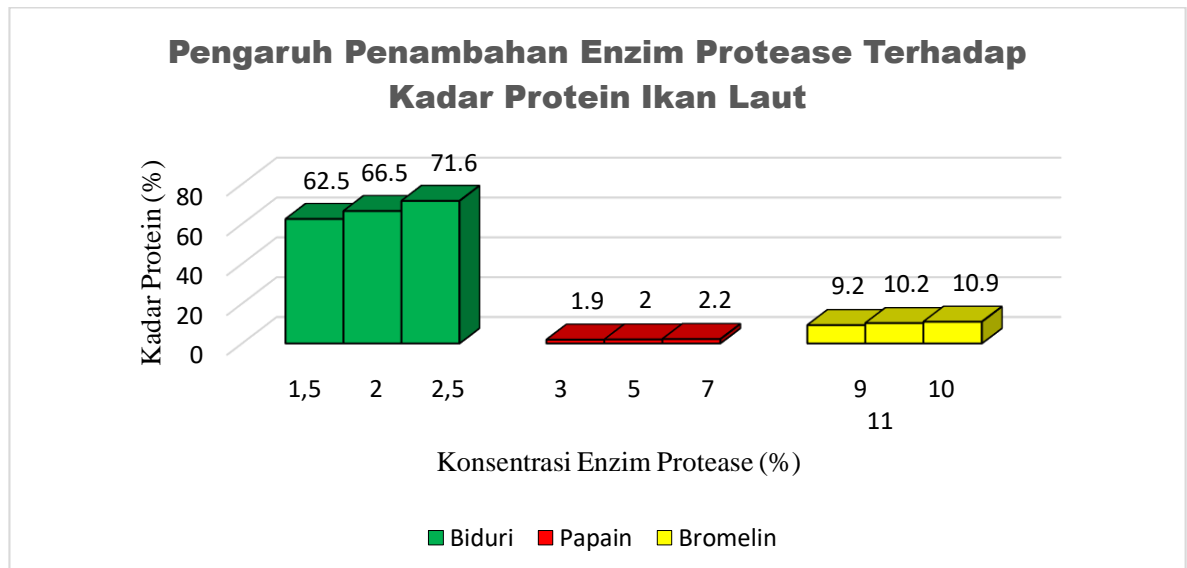
Penelitian yang dilakukan Permatasari, dkk., (2017) menggunakan enzim bromelin pada proses pembuatan hidrolisat protein tinta cumi-cumi kering. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar protein tertinggi terdapat pada perlakuan enzim bromelin 11%. Adapun kadar protein pada tinta cumi-cumi dapat dilihat pada Gambar 2. Hasil dari penambahan konsentrasi enzim bromelin yang berbeda pada tinta cumi kering menunjukkan kadar protein mengalami kenaikan. Hal ini dikarenakan kandungan pada enzim bromelin mampu memecah protein, sehingga apabila enzim ditambahkan pada sampel akan mampu menaikkan kadar protein terlarut dan meningkatkan mutu produk.

Dari hasil penelitian diatas dapat dilihat bahwa kadar protein mengalami peningkatan pada setiap perlakuan baik itu variasi konsentrasi, pH maupun lama hidrolisis. Selama hidrolisis terjadi konversi protein yang bersifat tidak larut menjadi senyawa nitrogen yang bersifat larut. Selanjutnya terurai menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana seperti peptida, asam amino dan amonia sehingga mudah diserap oleh tubuh. Peningkatan kadar protein hidrolisat ikan laut disebabkan oleh peningkatan konsentrasi enzim yang digunakan sehingga kandungan nitrogen terlarut juga mengalami peningkatan. Penambahan konsentrasi enzim menyebabkan protein meningkat, hal ini disebabkan enzim itu sendiri adalah protein (Baehaki, dkk., 2015). Haslaniza, dkk., (2010) menyatakan bahwa konsentrasi enzim protease yang semakin meningkat dalam proses

hidrolisis akan menyebabkan peningkatan kandungan nitrogen terlarut dalam hidrolisat protein ikan.

Hasil dari 7 jurnal yang telah direview menunjukkan bahwa kadar protein tertinggi (71,6%) terdapat pada penambahan enzim protease biduri 2,5% dengan lama hidrolisis 2 jam pada udang

windu dimana analisis proteinnya menggunakan metode spektrofotometri. Hal ini sesuai dengan pernyataan bahwa semakin besar penambahan enzim protease (papain, bromelin maupun protease biduri) maka semakin meningkat pula kadar protein ikan laut yang dihasilkan (Gambar 2).



Gambar 2. Grafik Pengaruh Penambahan Enzim Protease Terhadap Kadar Protein Pada Ikan Laut

Menurut Kusmiyati (2017), semakin besar penambahan enzim maka makin cepat reaksinya, tetapi pada batas-batas tertentu hasil hidrolisat yang dihasilkan akan konstan dengan meningkatnya konsentrasi enzim. Hal ini disebabkan penambahan enzim yang sudah tidak aktif lagi. Agar reaksi berjalan optimum, maka perbandingan jumlah antara enzim dan substrat harus sesuai. Jika enzim terlalu sedikit dan substrat terlalu banyak reaksi akan berjalan lambat bahkan ada substrat yang tidak terkatalisasi (Washudi, 2016). Berdasarkan penjelasan tersebut maka dapat disimpulkan bahwa penggunaan enzim yang berlebihan tidak memberikan pengaruh terhadap nilai protein terlarutnya karena selama proses tidak ada penambahan substrat dan substrat yang tersedia sudah habis digunakan selama proses hidrolisis.

Enzim protease terbukti dapat menghidrolisis protein ikan laut.

Hidrolisis ikatan peptida akan menyebabkan beberapa perubahan pada protein yaitu meningkatkan kelarutan karena bertambahnya kandungan NH_3^+ dan COO^- serta bertambahnya berat molekul protein atau polipeptida (Wahyuningtyas, 2018). Hidrolisis protein dengan enzim dapat menghasilkan produk hidrolisat yang terhindar dari perubahan dan kerusakan produk.

Pengaruh Metode

Analisis protein menggunakan beberapa metode diantaranya spektrofotometri, lowry dan kjedal. Metode kjedal merupakan metode yang sederhana untuk penetapan nitrogen total pada asam amino, protein dan senyawa yang mengandung protein. Metode ini cocok untuk menetapkan kadar protein yang tidak terlarut atau protein yang sudah mengalami koagulasi akibat proses pemanasan maupun proses pengolahan lain yang

biasa dilakukan pada makanan (Rohman & Sumantri, 2018).

Ada tiga tahapan pada metode kjedal yaitu tahap destruksi, destilasi dan titrasi. Pada tahap destruksi, sampel dipanaskan dengan asam sulfat pekat. Atom karbon (C) dan hidrogen (H) teroksidasi menjadi karbon monoksida (CO), karbondioksida (CO₂) dan H₂O. Atom nitrogen (N) akan berubah menjadi amonium sulfat atau (NH₄)₂SO₄. Untuk mempercepat destruksi maka ditambahkan katalisator natrium sulfat. Tahap kedua adalah destilasi. Pada tahap ini amonium sulfat dipecah menjadi amonia (NH₃) dengan penambahan NaOH sampai alkalis dan dipanaskan. Tahap ketiga adalah titrasi. Apabila penampung destilat yang digunakan adalah HCl maka sisa asam klorida yang tidak bereaksi dengan amonia dititrasi dengan larutan baku NaOH 0,1 N. Titik akhir titrasi ditandai dengan perubahan warna larutan dari biru menjadi merah muda.

Pada metode spektrofotometri UV-Visible menggunakan absorbansi sinar pada panjang gelombang 263 nm sebagai perkiraan konsentrasi protein dalam larutan, dimana adanya asam amino seperti triptofan, tirosin dan fenilalanin yang mempunyai gugus aromatik pada penyusun protein. Pada penetapan kadar protein secara spektrofotometri digunakan bovin serum albumin (BSA) sebagai pembanding. Metode ini lebih mudah dan cepat pengerjaannya, serta tidak membutuhkan pereaksi karena pembacaan dilakukan secara absorbansi langsung. Metode lowry merupakan pengembangan dari metode biuret. Kadar protein diukur absorbansinya pada panjang gelombang 600 nm. Metode lowry lebih sensitif dibandingkan dengan metode biuret (Rohman & Sumantri, 2018).

Dari 7 jurnal yang direview menunjukkan bahwa kadar protein tertinggi menggunakan metode spektrofotometri dimana sampel yang digunakan adalah udang windu. Hal ini karena dari segi keakuratan dan waktu

yang digunakan, metode spektrofotometri lebih baik dari metode kjedal. Hal terpenting pada metode spektrofotometri adalah penggunaan panjang gelombang dimana pada analisis kadar protein menggunakan panjang gelombang 263 nm. Selain itu pada metode spektrofotometri menggunakan bovin serum albumin (BSA) dimana memberikan reproduibilitas yang tinggi (Rohman & Sumantri, 2018). Waktu yang dibutuhkan dalam pengerjaannya juga cepat dibandingkan dengan metode kjedal karena pada metode spektrofotometri menggunakan alat. Pada metode kjedal ada 3 tahapan kerja yaitu tahap destruksi, tahap destilasi dan tahap titrasi sehingga dibutuhkan waktu yang lama dalam prosesnya (Rohman & Sumantri, 2018).

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian review dari beberapa jurnal yang telah dilakukan tentang pengaruh penambahan enzim protease terhadap kadar protein pada ikan laut, dapat disimpulkan bahwa enzim protease diantaranya enzim papain, bromelin dan protease biduri dapat digunakan sebagai enzim penghidrolisis protein. Proses hidrolisis protein pada ikan laut dengan enzim protease dapat meningkatkan kadar protein seiring bertambahnya konsentrasi enzim. Kadar protein tertinggi terdapat pada udang windu dengan penambahan enzim papain 2,5 % menggunakan metode spektrofotometri.

SARAN

1. Disarankan bagi institusi pendidikan untuk melakukan kajian tentang perbandingan metode analisis protein yang terbaik sehingga diperoleh hasil kadar protein yang maksimal;
2. Disarankan bagi peneliti selanjutnya untuk melakukan penelitian lebih lanjut tentang hidrolisis protein menggunakan enzim protease yang berbeda baik

yang bersumber dari tanaman, hewan maupun mikroorganisme;

3. Diharapkan bagi peneliti selanjutnya untuk melakukan eksplorasi penelitian lain mengenai potensi enzim protease selain sebagai enzim penghidrolisis protein.

DAFTAR PUSTAKA

- Baehaki, A., Lestari, S.D., & Romadhoni, A.R. 2015. Hidrolisis Protein Ikan Patin Menggunakan Enzim Papain dan Aktivitas Antioksidan Hidrolisatnya. *JPHPI*. 18(3):230-239.
- Gokoglu, N., Yerlikaya P., Ucak I., & Yatmaz H.A. 2016. Effect of Bromelain and Papain Enzymes Addition on Physicochemical and Textural Properties of Squid (*Loligo vulgaris*). *CrossMark*.
- Harahap, M.S., Suparmi, & Dahlia. 2018. Pengaruh Penambahan Konsentrasi Enzim Papain yang Berbeda Terhadap Karakteristik Hidrolisat Protein Udang Rebon (*Acetes erythraeus*). Riau: Universitas Riau [Jurnal].
- Hardi, J., & Diharnaini. 2014. Penggunaan Protease dari Getah Biduri dalam Produksi Flavor Udang Windu (*Penaeus monodon*). *Online Jurnal of Natural Science*. 3(2): 39-49.
- Haslaniza, H. 2010. Effect of Enzyme Concentration, Temperature and Incubation Time on Nitrogen Content and Degree of Hydrolysis of Protein Precipate from Cockle (*Anadara granosa*) Meat Wash Water. *Internasional Food Research Journal*. 17:147-152.
- Koesoemawardani, D., Nurainy, F., & Hidayati S. 2011. Proses Pembuatan Hidrolisat Protein Ikan Rucah. *Jurnal Natur Indonesia*. 13(3):256-261.
- Kristinsson, H.G. 2007. Aquatic Food Protein Hydrolysates, *Maximising the Value of Marine By-Product*. BocaRaton: CRC Pr.
- Kurniawan, Lestari, S., & Hanggita, R.J. 2012. Hidrolisis Protein Tinta Cumi-Cumi (*Loligo sp*) Dengan Enzim Papain. *Jurnal Fishtech*. 1(1):41-54.
- Kusmiyati, M. 2017. *Biokimia*, Kemenkes: Badan Pengembangan dan Pemberdayaan Sumber Daya Manusia Kesehatan.
- Mujianto, Revitriani, M., Witono, Y., & Jayus. 2015. Karakter Tepung Hidrolisat Protein Ikan Galama (*Pterotolithus*) Hasil Hidrolisis Enzimatis Menggunakan *Acid Protease Powder* (Sqzyme PSP-F). *Jurnal Teknik Industri HEURISTIC*. 12(1):45-52.
- Permatasari, J., Sumardianto, & Romadhon. 2017. Pengaruh Konsentrasi Enzim Bromelin Pada Kualitas Hidrolisat Protein Tinta Cumi-Cumi (*Loligo Sp.*) Kering. Semarang: Undip [Prosiding].
- Rohman, A., & Sumantri. 2018. *Analisis Makanan*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Rosdianti, I. 2008. Pemanfaatan Enzim Papain dalam Produksi Hidrolisat Protein dari Limbah Industri Minyak Kelapa. Bogor: Institut Pertanian Bogor [Skripsi].
- Sari, T.N. 2015. Karakteristik Hidrolisat Protein Ikan Wader (*Rasbora jacobsoni*) Secara Enzimatis dengan Enzim Protease dari Tanaman Biduri (*Calotropis gigantea*).Jember:Universi tas Jember. [Skripsi].
- Sulastris. 2010. Uji Peningkatan Kadar Protein Tape Ketan (*Oryza glutinosa auct*) dengan Penambahan Sari Buah Nenas

- (*Ananas comosus*)
Menggunakan Metode Spektrofotometri. Riau: Universitas Islam Negeri Sultan Syarif Kasim Riau Pekanbaru [Skripsi].
- Susanti, S.P. 2005. Karakterisasi Enzim Protease dari Getah Tanaman Biduri (*Calotropis gigantea*) Hasil Ekstraksi Menggunakan Amonium Sulfat. Jember: Universitas Jember [Skripsi].
- Wahyuningtyas, W.S. 2018. Aktivitas Antioksidan Hidrolisat Protein Ikan Air Laut dan Ikan Air Tawar. Jember: Universitas Jember [Skripsi].
- Washudi. 2016. *Biomedik Dasar (Anatomi, Fisiologi, Biokimia, Fisika, Biologi)*. Kemenkes: Badan Pengembangan dan Pemberdayaan Sumber Daya Manusia Kesehatan.
- Witono, Y., Kang, W.W. 2010. Specific Characteristic of Novel Cystein Protease from Indonesian “Biduri” (*Calotropis gigantea*). Korea: The Korea Food Conference and Symposium [Proceeding].
- Witono, Y., Taruna, I., Widrati, W.S., & Ratna, A. 2014. Hidrolisis Ikan Bernilai Ekonomi Rendah Secara Enzimatis Menggunakan Protease Biduri. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*. 25(2):140-145.
- Witono, Y., Aulanni'am, Subagio, A., & Widjanarko, S.B. 2006. Pemurnian Parsial Enzim Protease dari Getah Tanaman Biduri (*Calotropis gigantea*) Menggunakan Ammonium Sulphat. *Jurnal Teknologi Pertanian*. 7(1):20-26.