

ANALISIS SENYAWA INHIBITOR ENZIM KATEPSIN KULIT IKAN PATIN TERHADAP PENUNDAAN KEMUNDURAN MUTU CUMI-CUMI

Fitriana Dian Kusuma*, R. Susanti, Septiana Anggraini, Dyken Dwi Arlinda

¹Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Semarang

*Email: fitriadiankusuma@yahoo.co.id

Paper submit: 28 Agustus 2019, Paper publish: September 2020

Abstrak-Daya simpan cumi-cumi dipengaruhi oleh aktivitas enzim katepsin yang menyebabkan kemunduran mutu cumi-cumi pada hari ke tiga setelah fase post rigor. Aktivitas inhibitor katepsin alami dari ikan patin berpotensi menghambat kemunduran mutu ikan jenis lain. Penelitian ini dilakukan menggunakan dua variabel yaitu, konsentrasi inhibitor enzim katepsin yang diekstrak dari kulit ikan patin, dengan empat variasi yaitu 1:0; 1:1; 2:3; dan 3:2 dan lama inkubasi cumi-cumi pada fase post rigor selama 3, 7, dan 9 hari dalam ekstrak inhibitor. Hasil uji Two Way Anova menunjukkan bahwa konsentrasi perlakuan berbeda nyata dengan persentase penghambatan sedangkan lama penyimpanan tidak berbeda nyata ($p < 0,05$). Konsentrasi kemudian diuji lanjut dengan Duncan dan konsentrasi yang paling efektif untuk menghambat aktivitas enzim adalah konsentrasi 3:2 dengan persentase penghambatan 57%.

Kata kunci: Cumi-cumi, Kulit Ikan patin, Enzim Katepsin, Inhibitor sistein protease

Pendahuluan

Pendinginan merupakan salah satu teknik untuk mengatasi pembusukan ikan yang dilakukan selama penangkapan, pengangkutan, maupun penyimpanan (Siburian *et al.* 2012). Selain menggunakan teknik pendinginan, beberapa oknum menggunakan pengawet berbahaya untuk menjaga kesegaran ikan yaitu formalin. Pada tahun 2012 hingga 2017 cumi-cumi (*Loligo sp*) merupakan salah satu komoditas ekspor hasil laut yang terus mengalami kenaikan permintaan pasar hingga 19,96% dibandingkan dengan udang, rumput laut, tuna, cakalang, dll (KKP, 2017). Hal ini disebabkan karena cumi-cumi merupakan komoditas laut yang mengandung protein dan gizi yang baik untuk dikonsumsi

Cumi-cumi mempunyai daya simpan yang rendah akibat adanya kemunduran mutu setelah fase *post rigor*. Salah satu faktor yang mempengaruhi daya simpan cumi-cumi adalah aktivitas enzim katepsin. Aktivitas enzim akan meningkat dan mencapai titik tertinggi pada

pembusukan karena enzim akan menguraikan protein dan menghasilkan senyawa-senyawa metabolit yang menyebabkan perubahan bau, tekstur, dan cita rasa (Fentiana, 2009). Hasil penelitian Vaz-pires *et al.* (2008) menunjukkan bahwa cumi dengan perlakuan penyiangan memiliki kenampakan krem sedikit kecoklatan dan pucat, berbau busuk, tekstur yang tidak elastis dan sedikit empuk. Penilaian cumi-cumi dengan perlakuan tanpa penyiangan, memiliki kenampakan mantel berwarna krem kecoklatan dan pucat, berbau busuk, dan tekstur yang lunak.

Faktor penyebab kemunduran mutu cumi-cumi diantaranya adalah organoleptik (7-14 hari), enzimatis (3-6 hari), dan histologis (6 hari) (Alviana, 2017). Faktor yang paling cepat menyebabkan kemunduran mutu cumi-cumi adalah faktor enzimatis. Menurut Nurhayanti *et al.* (2015), enzim katepsin merupakan enzim proteolitik yang dapat memecah struktur protein pada tubuh makhluk hidup. Aktivitas enzim katepsin dapat dicegah dengan inhibitor spesifik. Hasil pengujian Fikri (2014), menunjukkan

bahwa ekstrak ikan patin mempunyai aktivitas inhibitor enzim katepsin yang hampir sama dengan *phenylmethylsulfonyl fluoride* (PMSF) konsentrasi 1 mM dan 5 mM, namun masih di bawah aktivitas inhibitor pepstatin 1 μ M (94,20%) serta aktivitas penghambatan EDTA sebesar 91,071% (1 mM) dan 92,857% (5 mM). Inhibitor spesifik terhadap enzim katepsin menurut Hanada *et al.* (2014) adalah *L-trans-Epoxy Succinyl-leucylamido (4-guanido) butane* atau E-64 yang mempunyai 4 gugus fungsi utama yaitu, *guanidyl, epoxide, 1,2-dicarboxyl groups* dan ikatan peptida.

Menurut Nurhayanti (2015), kulit ikan patin (*Pangasius djambal*) mempunyai kemampuan menghambat aktivitas enzim katepsin hingga 90%. Indonesia sejak tahun 2016 mengalami lonjakan budidaya ikan patin sebesar 437.111 ton dan mempunyai 6 perusahaan filet ikan patin dengan kapasitas produksi 350 ton per bulan. Kondisi ini sangat memungkinkan kulit ikan patin dimanfaatkan sebagai pengawet cumi-cumi yang permintaan pasarnya terus mengalami peningkatan (KKP, 2017).

Berdasarkan uraian di atas, maka perlu dilakukan penelitian aktivitas inhibitor enzim katepsin kulit ikan patin terhadap penundaan kemunduran mutu cumi-cumi. Hasil penelitian ini diharapkan dapat mendukung peningkatan kualitas perikanan nasional, khususnya cumi-cumi.

Metode Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium Biokimia, Mikrobiologi, Fisiologi Tumbuhan Jurusan Biologi, dan Laboratorium Riset Fisika Universitas Negeri Semarang. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan desain rancangan acak dengan dua pola faktorial. Faktor pertama adalah konsentrasi inhibitor enzim katepsin yang diekstrak dari kulit ikan patin, dengan empat variasi yaitu 1:0; 1:1; 2:3; dan 3:2. Faktor kedua adalah lama rendaman/inkubasi cumi-cumi pada fase *post rigor* selama 3, 7, dan 9 hari dalam ekstrak inhibitor. Setelah direndam, aktivitas enzim katepsin pada cumi-cumi diukur dengan metode spektrofotometri.

1. Ekstraksi inhibitor enzim katepsin dari kulit ikan patin (Dinu *et al.*, 2002)

Kulit ikan patin (*Pangasius sp*) dipisahkan dari daging dan komponen lainnya, kemudian kulit ikan patin dioven selama 7 hari dan dihaluskan dengan blender. Sebanyak 100 gram kulit ikan patin halus dihomogenisasi dengan 100 mL akuades dingin. Selanjutnya, disentrifugasi (Scilogex DM0412) pada suhu dingin dengan kecepatan 5000 rpm selama 30 menit. Supernatan diambil dan ditambahkan buffer McIlvaine's pH 5,5 (asam sitrat dan Sodium pospat (Merck)) dengan volume yang sama dengan supernatan. Campuran tersebut selanjutnya diinkubasi selama 10 menit pada suhu 80°C, dan disentrifugasi pada kecepatan 7000 rpm selama 15 menit. Supernatannya diambil dan disimpan pada suhu dingin. Ekstrak kulit ikan patin tersebut, selanjutnya diuji kandungan gugus fungsinya menggunakan FT-IR atau *IR spectry* (PerkinElmer Spectrum Version 10.03.06).

Ekstrak inhibitor enzim katepsin kulit ikan patin dibuat menjadi empat variasi konsentrasi yaitu 1:0 (1 bagian ekstrak inhibitor, tanpa buffer McIlvaine's), 1:1 (1 bagian ekstrak inhibitor, 1 bagian buffer McIlvaine's), 2:3 (2 bagian ekstrak inhibitor, 3 bagian buffer McIlvaine's), dan 3:2 (3 bagian ekstrak inhibitor, 2 bagian McIlvaine's).

2. Aplikasi Ekstrak Inhibitor Kulit Ikan Patin terhadap Cumi-cumi

Cumi-cumi direndam ke dalam ekstrak inhibitor enzim katepsin dengan konsentrasi yang telah dibuat. Kemudian, Cumi-cumi yang telah direndam ekstrak inhibitor diinkubasi pada suhu 4°C. Setiap hari ketiga, ketujuh, dan ke sembilan aktivitas enzim katepsin pada Cumi-cumi dihitung dengan metode spektrofotometri.

3. Ekstraksi enzim katepsin Cumi-cumi (Dinu *et al.*, 2002)

Setelah cumi-cumi direndam dalam ekstrak inhibitor enzim katepsin dari ikan patin, dengan variasi konsentrasi dan lama rendaman, cumi-cumi diekstraksi dan diuji aktivitas enzim katepsinnya. Sebanyak 10 gram daging cumi-cumi disuspensikan 10 mL akuades dingin 4°C, kemudian dihomogenisasi pada suhu 25°C.

Ekstrak tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 1000 rpm selama 10 menit, kemudian supernatan yang diperoleh disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Pelet yang dihasilkan dilarutkan dalam 0,1 M Buffer tris-HCl pH 7,4 (Tris base (Merck) dan HCl (Merck)) dengan perbandingan 1:5 dan disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit. Selanjutnya, supernatan yang mengandung enzim katepsin diambil untuk dianalisis.

4. Uji aktivitas enzim katepsin

Aktivitas enzim katepsin diukur dengan metode spektrofotometri, dengan langkah-langkah seperti pada Tabel 1.

Tabel 1. Pengukuran aktivitas enzim katepsin dengan spektrofotometer

Pereaksi	Sample (mL)	Standar (mL)	Blanko (mL)
Buffer tris 0,1 M pH 7,4	0,1	0,1	0,1
Katepsin	0,1	-	-
Tirosin (Merck)	0,1	0,1	-
Akuades	-	0,1	-
Hemoglobin 2% (Merck)	0,5	-	0,1
Preinkubasi 37°C, 30 menit			
Hemoglobin 2%	0,5	0,5	0,5
Diinkubasi 37°C 10 menit			
TCA 5% (Merck)	2	2	2
Disaring dengan kertas saring			
Filtrat	1	1	1
Folin (Merck)	1	1	1
Diamkan pada 37°C, 20 menit			
Absorbansi diukur dengan spektrofotometer (PerkinElmer Lambda 950 UV VIS) panjang gelombang 750 nm			

5. Perhitungan aktivitas enzim katepsin

Aktivitas enzim katepsin dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$UA = \frac{\text{Abs sample} - \text{Abs Blanko}}{\text{Abs Standar} - \text{Abs Blanko}} \times P \times \frac{1}{T}$$

Keterangan :

U = Jumlah tirosin yang dihasilkan per mL enzim per menit

P = Faktor pengenceran

T = Waktu inkubasi (10 menit)

6. Penghitungan penghambatan inhibitor kulit ikan patin

Persentase daya inhibisi dari inhibitor enzim dari kulit ikan patin dapat dihitung dengan rumus:

Persentasi Penghambatan =

$$\left(1 - \frac{(\text{aktivitas katepsin dengan inhibitor})}{(\text{aktivitas katepsin tanpa inhibitor})}\right) \times 100\%$$

7. Analisis Data

Data daya hambat inhibitor enzim, masing-masing dianalisis secara statistik dengan analisis sidik ragam (ANOVA) dua arah. Jika hasil analisis menunjukkan pengaruh nyata maka dilanjutkan dengan uji lanjut Duncan.

Hasil dan Pembahasan

Aktivitas enzim katepsin pada hari ke 3, 7, dan 9 menunjukkan bahwa, aktivitas enzim katepsin paling tinggi yaitu hari ke 7 dan mengalami penurunan pada hari ke 8 pada semua konsentrasi. Hasil penelitian Alviana (2017), menunjukkan bahwa cumi-cumi mengalami aktivitas enzim yang paling optimal pada hari ke-3 kemudian mengalami kenaikan sangat tajam pada hari ke-6 dan penurunan pada hari ke-9.

Konsentrasi inhibitor yang paling optimal untuk menghambat aktivitas enzim katepsin adalah 3:2 (Tabel 2). Pada konsentrasi tersebut, aktivitas enzim yang didapatkan paling rendah. Sedangkan aktivitas enzim katepsin paling tinggi didapatkan pada perendaman konsentrasi inhibitor 1:1. Hal tersebut tidak sesuai dengan penelitian Nurhayati (2015) yang menyatakan konsentrasi inhibitor kulit ikan patin 1:1 adalah konsentrasi paling efektif untuk menghambat aktivitas enzim katepsin pada ikan bandeng. Perbedaan hasil penelitian ini disebabkan karena habitat dari cumi-cumi dan ikan bandeng berbeda.

Tabel 2. Rata-rata aktivitas enzim (U/mL) Katepsin pada cumi-cumi setelah direndam ekstrak inhibitor kulit ikan patin

Konsentrasi Inhibitor	Lama inkubasi Aktivitas Enzim (U/mL)		
	Hari ke-3	Hari ke-7	Hari ke-9
1:0	0,2323	0,2685	0,1799
1:1	0,2493	0,2697	0,2101
2:3	0,2092	0,2536	0,1857
3:2	0,1900	0,2350	0,1708
Kontrol	0,3658	0,6120	0,5551

Habitat cumi-cumi adalah laut yang pada umumnya mempunyai pH air yang berbeda dengan ikan bandeng yang hidup di air tambak. Pada cumi-cumi yang mempunyai habitat di air laut mempunyai pH berkisar 7 - 9 (Poernomo *et al.*, 1988). Sementara ikan bandeng mempunyai pH sebesar 7- 8 (Faisyal *et al.*, 2016). Perbedaan pH pada ikan bandeng dan cumi-cumi menyebabkan aktivitas enzim pada cumi-cumi dan ikan bandeng berbeda.

Setelah diuji pengaruh inhibitor terhadap aktivitas enzim kemudian menguji persentase

penghambatan oleh inhibitor kulit ikan patin. Penghambatan oleh inhibitor kulit ikan patin pada cumi-cumi akan memperlambat pembusukan cumi-cumi. Inhibitor enzim katepsin tersebut dibagi menjadi empat konsentrasi sebagai variabel terikat dengan konsentrasi 1:0; 1:1, 2:3, 3:2 untuk dihitung absorbansinya secara *in vitro* pada hari ke 3, 7, dan ke 9. Semakin tinggi absorbansi sampel maka aktivitasnya semakin tinggi.

Berikut merupakan hasil persentase penghambatan inhibitor kulit ikan patin terhadap aktivitas enzim katepsin cumi-cumi.

Tabel 3. Persentase (%) Penghambatan Inhibitor Kulit Ikan Patin terhadap Enzim Katepsin cumi-cumi

Konsentrasi	Lama inkubasi		
	Hari ke-3	Hari ke-7	Hari ke-9
1:0	47,6667	47,1667	47,66667
1:1	46,1667	47,0000	46,1667
2:3	56,6667	48,6667	56,6667
3:2	58,6667	54,0000	58,6667

Hasil persentase diatas menunjukkan konsentrasi yang paling tepat dalam menghambat aktivitas enzim katepsin. Tabel 5 diatas menunjukkan bahwa pada konsentrasi 3:2 inhibitor enzim katepsin mengalami penghambatan yang paling tinggi hingga mencapai 54 - 58,67 % selanjutnya konsentrasi 2:3 mencapai 48-56 %, konsentrasi 1:0 mencapai 47,67 %, dan 1:1 antara 46-47 %. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi inhibitor

yang paling efektif dalam menghambat aktivitas enzim katepsin adalah pada konsentrasi 3:2. Konsentrasi 3:2 dilakukan dengan melarutkan inhibitor volume 3 bagian dan buffer mcllvaine's 2 bagian. Hasil perhitungan tabel diatas kemudian dilakukan pengujian ANNOVA dua arah dan variabel bebas yang signifikan diuji lanjut duncan. Berikut merupakan hasil dari uji ANNOVA penghambatan aktivitas enzim katepsin dengan ekstrak kulit ikan patin.

Tabel 4. Uji Annona Penghambatan Aktivitas Enzim Katepsin dengan Ekstrak Kulit Ikan Patin

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1948.305	11	177.119	3.385	.001
Intercept	189609.108	1	189609.108	3623.472	.000
Konsentrasi	1534.066	3	511.355	9.772	.000
Lama	181.854	2	90.927	1.738	.185
Konsentrasi * hari	266.785	6	44.464	.850	.537
Error	3139.681	60	52.328		
Total	194303.000	72			
Corrected Total	5087.986	71			

Pengujian ANOVA menunjukkan bahwa pengaruh hari dan hari* konsentrasi tidak menunjukkan perbedaan nyata terhadap penghambatan dengan taraf signifikansi 0,05 sehingga tidak

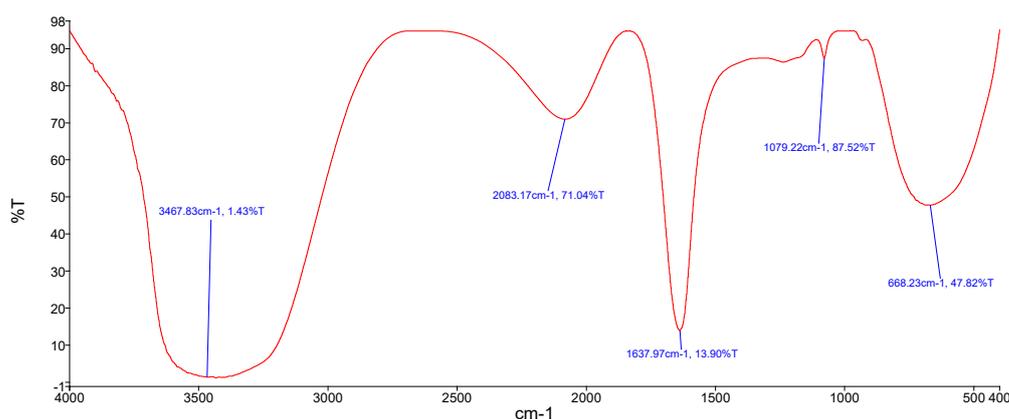
dilakukan uji lanjut duncan. Sedangkan, pengaruh konsentrasi inhibitor kulit ikan patin

berbeda nyata dengan persentase penghambatan terhadap enzim katepsin sehingga dilanjutkan uji lanjut duncan. Hasil dari uji lanjut duncan dapat dilihat pada Tabel 5.

Hasil pengujian FTIR pada Gambar 2 dapat menginterpretasikan sebagai gugus fungsi yang terdapat dalam suatu senyawa (Tabel 5).

Tabel 5. Hasil Uji Lanjut Duncan

Konsentrasi	N	Subset	
		1	2
1:1	18	46.666b	
1:0	19	47.105b	
2:3	17		54.588a
3:2	18		57.111a
Sig.		.856	.300



Gambar 1. Hasil Uji FTIR Ekstrak Kulit Ikan Patin

Tabel 6. Pembacaan Hasil FTIR

Peak Name	Bilangan Gelombang	Wilayah serapan	Keterangan	Referensi
7	668.23	500-1500	Gugus Sistein	Dachriyanus, 2004
6	1079.22	1000-1100	Gugus C=O	Kong dan Yu, 2007
5	1637.97	1600-1690	C=O Stretching	Jilie dan shaoning, 2007
4	2083.17	2936-2021	CH	Gende <i>et al.</i> , 2008
3	3401			
2	3435.42	3400	Gugus OH	Coates, 2002
1	3467.83			

Hasil uji FTIR diatas dapat disimpulkan bahwa senyawa tersebut mempunyai ciri khas dengan adanya gugus Carboyl (C=O), gugus hidroksi (-OH), dan carboxymethyl groups dan ikatan sulfida (sistein). Penghambatan oleh gugus OH terjadi karena alkohol mengandung suatu oksigen dengan dua pasang elektron valensi menyendiri yang bersifat polar, sehingga alkohol dapat membentuk ikatan hidrogen antara molekul-molekulnya, dengan air maupun senyawa lain apa saja, yang mengandung NH atau OH (Fessenden dan Fessenden, 1986). Sistein merupakan asam amino yang mempunyai gugus sulfhidril, gugus ini berinteraksi dengan produk 0-quinon membentuk senyawa Cystein Quinon Addition Compound (CQAC), yang mengakibatkan senyawa melanoidin yang menyebabkan perubahan warna tidak terbentuk. CQAC mempunyai struktur mirip dengan substrat, sehingga CQAC juga dapat berikatan dengan pusat aktif enzim berkompetisi dengan substrat, sehingga sistein dapat bersifat inhibitor kompetitif (Mardiah, 2011).

Simpulan

Aktivitas enzim katepsin cumi-cumi dapat dihambat oleh inhibitor kulit ikan patin pada konsentrasi 3:2 dengan aktivitas paling kecil pada Konsentrasi inhibitor enzim katepsin hari ke 3 mencapai 0,226 U/mL , hari ke 7 mencapai 0,2209 U/mL, dan hari ke 9 mencapai 0,18 U/mL. Penghambatan yang dihasilkan paling baik pada konsentrasi 3:2 dengan persentase penghambatan mencapai 57%.

Ucapan Terima kasih

Kami ucapkan terimakasih kepada Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi Direktorat Jenderal Pembelajaran dan Kemahasiswaan yang telah memberikan dana penelitian yang terdapat pada surat nomor 1020/B3.1/KM/2018 sehingga penelitian ini dapat terlaksana dan berjalan dengan lancar.

Daftar Pustaka

- Alviana D. (2017). Kemunduran Mutu Daging Cumi-Cumi Selama Penyimpanan Suhu Dingin Berdasarkan Aspek Enzimatis Dan Histologis. *Skripsi*. Departemen Teknologi Hasil Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Bogor: Institut Pertanian Bogor
- Coates J.,P. (2002). The future challenges facing the development of new antimicrobial drugs. *US National Library of Medicine National Institutes of Health*, 1(11): 895-910.
- Dachriyanus. (2004). Analisis Struktur Senyawa Organik Secara Spektrofotometri, Hal 1-37, Andalas University Press, Padang.
- Dinu D, Dumitru IF, Neichifor MT. 2002. Isolation and Charecterization of Two Chatepsin from Muscle Carrasius Aurutus gibelio. *Roum Biotechnol*, 7(3) : 753-758.

- Faisyal Y, Rejeki S, Widowati L.,L. (2016). Pengaruh Padat Tebar Terhadap Pertumbuhan dan Kelulushidupan Ikan Bandeng (*Chanos Chanos*) di Keramba Jaring Apung di Perairan Terabrasi Desa Kaliwlingi Kabupaten Brebes. *Journal of Aquaculture Management and Technology*, 5(1): 155-161.
- Fentiana N. (2009). Peranan enzim protease jeroan ikan bandeng (*Chanos chanos*) dalam proses kemunduran mutu ikan. *Prosiding Seminar Nasional Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan*: 25-34.
- Fessenden, R.J. and J.S. Fessenden. (1986). Kimia Organik Dasar Edisi Ketiga. Jilid 1. Terjemahan oleh A.H. Pudjaatmaka. *Erlangga*. Jakarta.
- Fikri M., Z, Nurhayati T, Salamah E. 2014. Ekstraksi dan Karakterisasi Parsial Ekstrak Kasar Enzim Katepsin dari Ikan Patin. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*. 25(1) : 119-123.
- Gende, B. L., Floris, I., Fritz, R., and Eguaras, M. J. (2008). Antimicrobial Activity of Cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) Essential Oil and Its Main Components Against *Paenibacillus* Larvae From Argentine. *Bulletin of Insectology*, 61(1): 1-4.
- Lopez-Caballero, M., O, Martinez-Alvarez, M.C, Gomez-Guillen, and P. Montero. (2006). Effect of natural compounds alternative to commercial antimelanotics on polyphenol oxidase activity and microbial growth in cultured prawns (*Marsupenaeus tiger*) during chilled storage. *Eur. Food Res. Technol.* 223:7-15.
- Hanada K, Tamai M, Yamagishi M, Ohmura S, Sawaja J & Tanaka I. (2014). Isolation and Characterization of E-64, a New Thiol Protease Inhibitor. *Agricultural and Biological Chemistry*, 42(3): 523-528.
- [KKP] Kementerian Kelautan dan Perikanan. (2017). Statistik Perikanan Tangkap Indonesia menurut Provinsi Tahun 2017. Jakarta (ID): Kementerian Kelautan dan Perikanan.
- Kong, J dan Yu, S. (2007). Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis Of Protein Secondary Structures. *Acta biochimica et biophysica sinica* 39(8): 549-559.
- Mardiah E. (2011). Mekanisme Inhibisi Enzim Polifenol Oksidase Pada Sari Buah Markisa Dengan Sistein Dan Asam Askorba. *J.Ris.Kim.* 4(2): 32-37.
- Nurhayantai T. (2015). Natural Cathepsin Inhibitor to Inhibit Milkfish Deterioration during Chilling Storage. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis*, 7(2) : 521-524.
- Poernomo A. (1988). Pembuatan Tambak Udang di Indonesia. Departemen Pertanian, Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Balai Penelitian Perikanan Budidaya Pantai, Maros.
- Sibirian ETP, Pramesti D, Nana K. (2012).. Pengaruh suhu dan waktu penyimpanan terhadap pertumbuhan bakteri dan fungi ikan bandeng. *Unnes Journal of Life Science*, 1(2):101- 105.
- Vaz-Pires P & Seixas P. (2006). Development of new quality index method (QIM) schemes for cuttlefish (*Sepia officinalis*) and broadtail shortfin squid (*Illex coindetii*). *Food Control*. 17: 942-949.