

PERUBAHAN KELARUTAN PROTEIN, KANDUNGAN LISIN (AVAILABLE), METIONIN, DAN HISTIDIN BANDENG PRESTO SELAMA PENYIMPANAN DAN PEMASAKAN ULANG

(THE CHANGE OF PROTEIN SOLUBILITY, AVAILABLE LYSINE, METIONINE, AND HISTIDIN CONTENTS OF "BANDENG PRESTO" DURING STORAGE AND RECOOKING)

Suwedo Hadiwiyoto^{*)}, Sri Naruki^{*)}, Sri Satyanti^{*)},
Hastini Rahayu^{†)}, Diana Riptakasari^{‡)}

ABSTRACT

"Bandeng presto" is a product made by pressure cooking of fresh milkfish (*Chanos chanos*). Before it is consumed generally stored at low temperature (0-4°C), after that it is recooked by steaming or deep frying.

During low temperature storage the solubility of protein decreased but there was no change in isoelectric zone found at pH 5-6 based on the solubility pattern data, which is showed a structural changes on protein molecules. Decreasing on the content of available lysine, methionine, and histidin during storage was obtained as a function of time but they were not significant.

Recoking by steaming and deep frying reduced contents of those amino acids to the level lower than amino acid pattern recommended by FAO/WHO. Decreasing of available lysine, methionine, and histidin was found higher by frying than those by steaming.

Keywords : *Bandeng presto; protein solubility; available lysine, methionine; and histidin.*

PENDAHULUAN

Bandeng presto merupakan jenis makanan dari ikan bandeng (*Chanos chanos*) yang sangat terkenal terutama di daerah Semarang dan sekitarnya. Produk ini bahkan sudah dipasarkan hampir di semua kota di Pulau Jawa dan beberapa kota besar di luar Pulau Jawa. Bandeng presto dibuat dengan memasak (mengukus) pada tekanan tinggi. Suhu pemasakan pada umumnya mencapai 115-120°C dengan tekanan hampir dua atmosfer. Waktu pemasakan dapat bervariasi tergantung pada keperluan. Selama pemasakan, akibat suhu dan tekanan yang tinggi, daging dan tulang ikan bandeng akan menjadi lunak. Hal ini yang menyebabkan bandeng presto disukai karena duri ikan bandeng sangat lembut dan runcing menjadi hancur sehingga tidak membahayakan jika dimakan. Kajian mengenai kerapuhan tulang sudah banyak dipelajari (Ruswanto, 1998;

Jamaluddin, 1998). Optimasi pemasakan juga sudah dipelajari oleh Hadiwiyoto dan Naruki (1998). Sedangkan peneliti-peneliti lain misalnya Ariffudin (1991) dan Yusuf (1990) juga telah mempelajari aspek pelunakan duri ikan pada pemasakan bandeng presto. Meskipun demikian terhadap aspek kimiawi produknya (bandeng presto) belum banyak keterangan diperoleh. Diketahui bahwa pemasakan dapat menyebabkan terjadinya proses denaturasi protein, hidrolisis protein dan lemak, oksidasi, peruraian maupun perubahan struktur senyawa-senyawa sehingga terbentuk senyawa baru (Bender, 1978; Leszkiowics and Kasperk, 1988). Ikan merupakan bahan pangan sumber protein dengan asam-asam amino esensial dan nonesensial yang sempurna. Dengan adanya pemasakan, lebih-lebih lagi pemasakan yang berulang-ulang, kestabilan protein dan asam amino dapat berubah.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penyimpanan bandeng presto pada suhu dingin dan pemasakan ulang, baik pada bandeng presto segar mau pun yang sudah disimpan, terhadap sifat larut protein dan kandungan beberapa asam amino esensial, yaitu lisin (available), metionin, dan histidin. Asam amino lisin dan metionin adalah asam-asam amino esensial untuk orang dewasa dan anak-anak sedangkan histidin esensial untuk bayi (Robinson, 1987). Histidin meskipun tidak esensial untuk orang dewasa dan anak-anak tetapi juga diperlukan. Ketiga asam amino ini juga merupakan asam-asam amino pembatas pada kebanyakan bahan pangan sehingga perubahannya selama penyimpanan dan pemasakan ulang perlu diketahui dan diinformasikan.

METODE PENELITIAN

Preparasi Bandeng Presto

Ikan bandeng (*Chanos chanos*) segar dengan spesifikasi panjang absolut rata-rata 25cm atau berat rata-rata 250 g/ekor dari distributor EMFA Yogyakarta disiangi dengan membuka isi perutnya dan menghilangkan isinya. Setelah dicuci bersih sehingga kotoran, sisa-sisa darah dan

^{*)} Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

^{†)} Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Wangsa Manggala Yogyakarta

^{‡)} Alumni Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

lapisan tipis di dalam rongga perut yang warnanya hitam menjadi hilang, ikan bandeng direndam dalam larutan bumbu (proses kuring). Bumbu dibuat dengan komposisi 25g kunyit, 20g bawang putih, 100g garam dapur briket dan 250ml air, diblender selama lima menit pada kecepatan tinggi sehingga homogen. Larutan bumbu ini diencerkan dengan menambahkan 750ml air dan digunakan untuk merendam 1kg ikan bandeng. Lama kuring adalah 12 jam pada suhu 4-6°C. Sebelum dimasak menjadi bandeng presto, ikan ditiriskan terlebih dahulu pada suatu angas dari kawat aluminium. Metoda pemasakan yang digunakan adalah pengukusan dengan menggunakan otoklav pada suhu 121°C dengan tekanan 15psi selama 60 menit dengan kapasitas 5kg untuk setiap kali masak. Hasil pemasakan merupakan bandeng presto yang siap digunakan dalam penelitian.

Perlakuan

Bandeng presto segar adalah bandeng presto yang baru diperoleh dari pemasakan tanpa ada perlakuan lain sesudahnya. Bandeng presto ini kemudian dikemas dalam plastik polietilen transparan dengan ketebalan 0,05mm (PE 0.5) yang tidak tertutup rapat (keadaan aerobik) dan disimpan. Secara teratur diambil dan dilakukan pemasakan ulang dengan pengukusan dan penggorengan (lihat bawah) serta dilakukan analisis terhadap protein terlarut (Lowry *et al.*, 1951), kelarutan protein pada berbagai kondisi pH (Kinsella, 1976), kandungan asam amino lisin, metionin, dan histidin.

Pengukusan Ulang

Bandeng presto yang telah disimpan dikukus ulang dengan alat kukus tanpa tekanan tinggi (tekanan 1 atm) pada suhu $\pm 100^\circ\text{C}$ selama 20 menit. Setelah didinginkan pada suhu kamar baru dilakukan analisis parameter yang diperlukan.

Perlakuan Penggorengan

Metoda penggorengan "deep fat frying" pada suhu 170°C digunakan untuk memperoleh bandeng presto goreng. Bandeng presto utuh dimasukkan ke dalam minyak pada saat minyak mulai mendidih yang ditandai dengan timbulnya aliran konveksi pada minyak. Setelah dua menit penggorengan ikan dibalik dan dilanjutkan penggorengan selama 2 menit. Selesai penggorengan ikan diangkat dengan menggunakan angas dari kawat aluminium supaya sisa-sisa minyak dapat ditiriskan oleh gaya grafitasi sampai pada akhirnya bandeng presto menjadi dingin pada suhu kamar. Analisis dikerjakan setelah ikan menjadi dingin.

Analisis Kandungan Lisin (available), Metionin dan Histidin

Semua bahan kimia yang digunakan adalah dari Sigma Chemical Co., Ltd. USA dan UK dengan standar kualitas proanalisis kecuali disebutkan. Sebagai sampel analisis adalah daging ikan. Bagian ini diambil dari bandeng presto dengan memisahkan kepala, tulang, sirip, ekor, dan sisiknya.

Daging digerus dengan mortir sampai lembut supaya homogen.

Prosedur yang dikemukakan oleh Kakade and Ellinger (1989) digunakan untuk analisis kandungan lisin available. Sampel daging ikan yang sudah dilembutkan dengan mortir sebanyak 1g disuspensikan dalam 100ml aquades. Suspensi (1ml) dipindahkan ke dalam erlenmeyer, kemudian ditambah larutan 4%w/v natrium bikarbonat. Kemudian dipanaskan pada suhu 40°C selama 10 menit dengan menggunakan penangas air. Kepadanya lalu ditambahkan larutan 0,1%v/v TNBS (trinitrobenzene sulfuric acid, Wakko Chem., Ltd., Japan) dan pemanasan dilanjutkan pada suhu yang sama selama 110 menit. Selanjutnya ditambahkan 3ml larutan 6N asam klorida. Erlenmeyer ditutup dengan kapas dan kertas payung, lalu dipanaskan di dalam otoklav pada suhu 120°C selama 60 menit. Setelah didinginkan lalu ditambah 5ml aquades, disaring dengan kertas saring Whatman No. 1, dan pada filtrat yang terkumpul diekstraksi dengan 10ml eter. Fraksi eter dipisahkan (dibuang), sedangkan fraksi air dipanaskan pada penangas air untuk menghilangkan sisa eter yang masih tertinggal. Setelah itu ditera pada panjang gelombang 336nm dengan menggunakan spektrofotometer. Kandungan lisin available ditentukan dengan mencocokkan absorbensi yang diperoleh dengan kurva standar lisin yang dibuat dengan prosedur yang sama dengan konsentrasi bervariasi antara 0-1mg/ml.

Kadar metionin ditentukan sebagai berikut (Block, 1960). Sampel daging ikan lembut sebanyak 1g disuspensikan dalam 100ml aquades. Suspensi (7,5ml) dipindahkan ke dalam gelas piala, dan ditambahkan ke dalamnya 1,5ml larutan 5N natrium hidroksida, 1,5ml larutan 1% w/v glisin dan 0,3g kristal natrium nitrosit. Kemudian dipanaskan pada penangas air bergoyang pada suhu 40°C selama 15 menit. Selanjutnya didinginkan pada penangas es selama 5-7 menit. Selama pendinginan tambahkan 3ml larutan 6N asam klorida, diaduk selama pendinginan supaya campuran menjadi homogen. Dilanjutkan dengan pendinginan 1-2 menit tanpa pengadukan. Setelah diangkat dari penangas es, didiamkan pada suhu kamar selama 15 menit. Peneraan absorben pada panjang gelombang 508nm dengan menggunakan spektrofotometer. Absorbensi kemudian dicocokkan dengan kurva standar metionin (0-2mg/ml) untuk menentukan kadar metionin bahan.

Kadar histidin ditentukan dengan prosedur yang dikemukakan oleh Block (1960). Sampel daging ikan lembut (1g) disuspensikan ke dalam 100ml aquades. Pindahkan 5ml suspensi ke dalam gelas erlenmeyer, lalu tambahkan 0,5ml larutan 2N asam sulfat dan diamkan selama 15 menit. Tambahkan 0,25g bromin dan segera simpan pada ruang gelap selama 2,5 jam. Tambahkan 5-6ml reagen arsenat (3g As₂O₃ dalam 10ml larutan 10% w/v NaOH, diencerkan sampai 100ml dengan H₂O), campur sampai homogen kemudian tambah lagi 2,5ml reagen asetat (90ml H₂O ditambah dengan 2,1ml asam asetat glasial dan 0,26ml larutan 1% w/v CuSO₄.5H₂O, kemudian diencerkan sampai 100ml dengan aquades dan ditambah 100g Na-asetat) setelah 14 menit. Encerkan dengan aquades dingin (4°C) sampai volumenya 10ml. Tera pada panjang gelombang 540nm

dengan spektrofotometer. Kandungan histidin dihitung dengan menggunakan kurva standar histidin (0-1mg/ml).

Analisis proksimat (kadar protein total, lemak, abu, air) dikerjakan dengan prosedur yang dikemukakan oleh Sudarmadji *dkk.* (1991), kadar karbohidrat dihitung dengan cara "by difference".

Rancangan Percobaan

Penelitian dirancang dengan Rancangan Acak Blok Lengkap dengan pola faktorial tunggal (penyimpanan) dan dua faktor (penggorengan dan pengukusan). Data dianalisis dengan anava (Mendelhall, 1987).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Komposisi kimiawi bandeng presto segar berdasarkan analisis proksimat diberikan pada Tabel 1. Tampak bahwa kadar karbohidrat besarnya lebih dari 11%, sedangkan berdasarkan berbagai pustaka kadar karbohidrat daging ikan pada umumnya tidak lebih dari 1%. Besarnya kadar karbohidrat bandeng presto lebih disebabkan oleh metoda analisis yang digunakan, yaitu metoda "by difference" yang berarti mengurangi angka 100% dengan kadar air dan jumlah persentase kadar padatan selain karbohidrat. Besarnya kadar karbohidrat juga disebabkan karena berkurangnya kadar air dan terikut sertanya kadar zat-zat yang tidak dapat teranalisis dalam analisis proksimat, seperti vitamin, serat kasar (khitin, lignin, glikogen, dsb.).

Tabel 1
Proksimat Bandeng Presto

| Komponen | Persen |
|----------------|-----------------|
| Protein | : 16,60 ± 0,092 |
| Lemak | : 3,93 ± 0,259 |
| Karbohidrat *) | : 11,84 |
| Abu | : 2,58 ± 0,163 |
| Garam | : 2,19 ± 0,190 |
| Air | : 65,05 ± 0,028 |

*) by difference

Kadar protein dan lemak bandeng segar masing-masing pada umumnya rata-rata 20% dan 4-5%, sedang kadar airnya mencapai kurang lebih 75% (Fitriyatun, 1982; Bustaman, 1984). Hal ini menunjukkan bahwa selama pemasakan terjadi kehilangan atau pengurangan senyawa-senyawa tersebut. Selama pemasakan dengan uap panas dapat menyebabkan terjadinya hidrolisa protein dan lemak. Sebagian dari protein yang terhidrolisa mudah larut dan keluar bersama-sama dengan terbentuknya drip. Panas yang menyebabkan lemak menjadi berkurang viskositasnya sehingga akan meleleh pada permukaan yang pada akhirnya akan menetes bersama-sama drip yang terbentuk selama pemasakan. Pemanasan pada suhu tinggi dapat menyebabkan percepatan oksidasi sehingga terjadi perubahan asam-asam lemak menjadi polimer, monomer, karbonil (Leszkiewicz

and Kasperek, 1988) yang mengakibatkan kehilangan lemak pada bahan. Bender (1978) juga menyampaikan bahwa pemanasan menyebabkan kehilangan lemak karena terbentuknya senyawa-senyawa volatil karbonil, asam-asam keto, asam epoksi dan lain sebagainya. Meski pun demikian bandeng presto tetap merupakan produk makanan kaya protein dengan kandungan lemak menengah.

Jika bandeng presto segar disimpan dalam kemasan plastik yang tidak tertutup rapat (keadaannya tetap aerobik) protein terlarutnya menurun sejalan dengan semakin lamanya penyimpanan (Gambar 1). Pengukusan mau pun penggorengan bandeng presto segar mau pun yang sudah disimpan dalam waktu tertentu (0-16 hari pada suhu 4-6°C) akan lebih menurunkan kandungan protein terlarutnya (Gambar 1). Meski pun demikian penurunan kadar protein terlarut sebagai akibat pemasakan ulang (pengukusan dan penggorengan) boleh dikatakan tidak mengubah pola kelarutan protein pada berbagai pH (Gambar 2). Hal ini menunjukkan bahwa selama penyimpanan protein telah mengalami denaturasi yang menyebabkan protein sukar larut tetapi tidak mengubah daerah titik isoelektrisnya atau dengan kata lain telah terjadi renaturasi melalui agregasi atau pembentukan struktur molekuler yang bersifat mirip dengan molekul awalnya. Dengan kata lain menurunnya kadar protein terlarut selama penyimpanan menunjukkan terjadinya perubahan struktur pada molekul protein. Penyimpanan pada suhu rendah memungkinkan terjadinya denaturasi pada protein. Jing and Lee (1985) melaporkan bahwa penyimpanan pada suhu beku sekali pun dapat menyebabkan protein ikan mengalami denaturasi. Di samping itu, interaksi berbagai senyawa yang ada dalam daging ikan dapat menyebabkan perubahan sifat protein. Demikian pula pemanasan menyebabkan protein ikan akan kehilangan sifat larutnya sehingga menurunkan kelarutan protein. Kelarutan protein terendah umumnya terletak pada pH 5-6.

Penggorengan bandeng presto berarti memberikan dua kali perlakuan pemanasan. Yang pertama pada saat pemasakan ikan bandeng menjadi bandeng presto dan yang kedua pada saat penggorengan. Pemasakan ulang dengan penggorengan bandeng presto segar menurunkan sekitar 50% kandungan lisin available, metionin, dan histidin (Gambar 3). Sementara itu pengaruh penyimpanan bandeng presto segar terhadap ketiga asam amino tersebut dapat dilihat pada Gambar 4. Dari data pada Gambar 4 tersebut ternyata penyimpanan tidak banyak berpengaruh pada kandungan asam-asam amino lisin available, metionin, dan histidin. Penurunan kandungan asam amino tersebut selama penyimpanan sangat kecil. Dengan analisis regresi (Sokal and Rohlf, 1977), "slope" penurunan regresi linear untuk ketiga asam amino tersebut masing-masing adalah -0,0505, -0,0328, dan -0,028 tidak menunjukkan signifikansinya ($P=0,05$). Meski pun demikian patut dicurigai penurunan histidin selama penyimpanan. Histidin dapat berubah menjadi histamin, suatu senyawa yang bersifat toksis, melalui reaksi dekarboksilasi yang dikatalisis oleh enzim dekarboksilase yang dihasilkan oleh bakteri (Eskin *et al.*, 1976). Kemungkinan di antara bakteri-bakteri psikrofil ada yang mampu menghasilkan dekarboksilase. Penurunan

kandungan asam amino selama pemanasan dapat disebabkan oleh peristiwa oksidasi (Suhardi, 1988), terjadinya rekasi Maillard antara protein atau asam amino dengan karbohidrat. Muhtadi (1989) menjelaskan bahwa pengurangan lisin selama pemanasan karena gugus amino epsilon yang ada berikatan dengan gula reduksi. Sedangkan Bender (1978) dan Ashoor and Zent (1996) melaporkan bahwa lisin merupakan asam amino yang sangat sensitif terhadap reaksi maillard, diikuti oleh metionin dan histidin. Meski pun demikian reaksi ini kecil kemungkinannya terjadi pada bahan pangan yang kandungan karbohidratnya rendah. Pengurangan lisin lebih cenderung disebabkan oleh terbentuknya senyawa kompleks seperti piroisin (ϵ -N-(2-pirouil-metil)-L-lisin) dan lisinoalanin (Bender, 1978) dan ikatan peptida selama pemanasan antara gugus amino pada lisin dengan gugus amino pada asam amino lainnya, yaitu asparagin dan glutamin sehingga terbentuk δ -N-(γ -glutamil)lisil atau δ -N-(β -aspartil)lisil (Hegarty, 1978).

Kerusakan metionin selama pemanasan oleh karena terbentuknya metionin sulfon (Bender, 1978). Hegarty (1986) mengatakan bahwa pemanasan ikan mackerel pada suhu 126°C dapat menurunkan metionin sebanyak 10% sedangkan Bender (1978) melaporkan bahwa secara umum metionin dapat hilang sebanyak 25% pada bahan pangan selama pemasakan dengan panas. Tidak diketahui banyak tentang mekanisme kerusakan histidin selama pemanasan yang menyebabkan penurunan kandungannya dalam bahan. Satu-satunya kemungkinan adalah peristiwa hidrolisis protein yang menyebabkan bebasnya asam amino tersebut kemudian ikut terbuang bersama drip yang terbentuk selama pemanasan. Bender (1978) menambahkan bahwa pada gugus beberapa asam amino termasuk histidin dapat mengadakan ikatan dengan substansi reduksi dalam bahan.

Pengurangan kandungan asam amino dalam bahan menyebabkan penyediaan asam amino untuk tubuh menjadi berkurang. Kandungan lisin umumnya menjadi pembatas pada berbagai bahan pangan karena banyaknya bahan pangan yang kandungan lisinnya rendah, terutama asam amino lisin yang siap dicerna baik dalam keadaan bebas mau pun terikat dalam protein (available lysine). FAO/WHO menyarankan pemenuhan asam amino lisin dan metionin (termasuk sistin) masing-masing adalah 12 dan 13mg/kg berat badan untuk orang dewasa, dan 60 dan 27mg/kg berat badan untuk anak-anak, sedangkan untuk bayi adalah 103 dan 58mg/kg berat badan ditambah 28mg histidin/kg berat badan (Robinson, 1987). Melihat saran badan-badan dunia tersebut kandungan ketiga asam amino tersebut menjadi lebih rendah pada bandeng presto yang dimasak ulang mau pun yang disimpan. Untuk memenuhi kebutuhan ketiga asam amino tersebut seorang dewasa harus makan lebih banyak porsinya.

KESIMPULAN

Dapat disimpulkan bahwa selama penyimpanan dan dengan dilakukannya pemasakan ulang sifat larut protein menjadi menurun dan ketersediaan asam amino lisin dan kandungan metionin serta kandungan histidin juga berkurang. Adanya kemungkinan pembentukan histamin

selama penyimpanan, disarankan untuk mengadakan penelitian di bidang ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Ariffudin, 1991. *Bandeng presto*, Kumpulan Hasil Penelitian Teknologi Pasca Panen Perikanan, Jakarta, Balai Penelitian Teknik Perikanan.
- Ashoor, S.H. and Zent, J.B., 1984. Maillard browning of common amino acids and sugar, *J. Food Sci.*, 49 : 1206-1208.
- Bender, A.E., 1978. *Food processing and nutrition*, London, Academic Press.
- Block, R.J., 1960. Amino acid analysis of protein hydrolyzates (dalam *Analytical method of protein chemistry*, R. Alexander and R.J. Block, Eds.), Vol. 2, Oxford, Pergamon Press, 1-56.
- Bustaman, S., Murtini, J.T., Rahayu, N. dan Putro, S., 1984. Studi pendahuluan identifikasi dan isolasi flavour udang dan bandeng, *Laporan Penelitian Teknologi Perikanan No. 30*, Jakarta, Lembaga Penelitian Teknologi Ikan.
- Eskin, N.A.M., Hendersen, A.M., and Send, R.I.T., 1971. *Biochemistry of foods*, New York, Academic Press.
- Fitriyatun, 1982. Pengolahan bandeng asap, *Skripsi S-1*, Yogyakarta, Fakultas Teknologi Pertanian UGM.
- Hadiwiyoto, S. dan Naruki, S., 1998. Optimisasi kondisi pemasakan bandeng presto, *dalam preparasi untuk publikasi Agritech*.
- Hegarty, P.V.J., 1978. *Influence of food processing on nutrition protein*, University of Minesota, St. Paul, USA.
- Jamaluddin, 1998. Pelunakan tulang ikan selama dalam pemanasan, *Thesis S-2*, Yogyakarta, Program Studi Mekanisasi Pertanian Program Pasca sarjana UGM.
- Jing, S. and Lee, T., 1985. Changes in free amino acids and protein denaturation of fish muscle during frozen storage, *J. Agric. Food Chem.*, 33 : 834-844.
- Kakade, M.L. and Ellinger, I.E., 1969. Determination of available lysine in proteins, *Anal. Biochem.*, 27 : 273.
- Kinsella, J.E., 1976. Functional properties of proteins in food : a survey, *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 7 (4) : 219-270.
- Leszkiewicz, B. and Kasperek, M., 1988. The effect of heat treatment on fatty acids of rapeseed oils, *J. Ass. Oil Chem. Chem.*, 65 (9) : 1511-1515.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193 : 265-275.
- Mendelhall, W., 1987. *Introduction to probability and statistics*, Boston, Duxbury Press, 7th ed.
- Muchtadi, D., 1989. *Evaluasi nilai gizi pangan*, Bogor, PAU Pangan dan Gizi IPB.
- Robinson, D.S., 1987. *Food biochemistry and nutrition value*, New York, Longmans & Scientific Technical.

Ruswanto, A., 1996. Pengaruh lama pemasakan terhadap kerapuhan tulang dan komposisi asam lemak serta umur simpan ikan nila (*Oreochromis sp.*) duri lunak, *Thesis S-2*, Program Studi Ilmu dan Teknologi Pangan, Yogyakarta, Program Pasca Sarjana UGM.

Sokal, R.R. and Rohalf, F.J., 1973. *Introduction to biostatistics*, Tokyo, Toppan Company, Ltd.

Suhardi, 1988. *Kimia dan teknologi protein*, Yogyakarta, PAU Pangan dan Gizi UGM.

Yusuf, I.B., Sutanto, L., Ustadi, Rosich, A., Azis, P. dan Supardjo, S.D., 1990. *Pelunakan duri berbagai jenis ikan olahan*, Fakultas Pertanian UGM Yogyakarta.