

# Potensi Antioksidan dan Karakterisasi Pada Kolagen Teripang (*Stichopus horrens*)

Askiya Intan Suryani, Delianis Pringgenies\*, Wilis Ari Setyati

Departemen Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro  
Jl. Prof. Jacob Rais, Tembalang, Semarang, Jawa Tengah 50275 Indonesia  
E-mail: delianispringgenies@lecturer.undip.ac.id

## Abstract

### Antioxidant Potential and Characterization of Collagen in Sea Cucumber (*Stichopus horrens*)

*Stichopus horrens*, a marine organism known for its numerous health benefits, particularly in the medical field, was the focus of this study, which aimed to evaluate the collagen characterization and antioxidant potential of this species. An exploratory descriptive method was employed. The *S. horrens* samples were extracted using NaOH, CH<sub>3</sub>COOH, and distilled water to obtain collagen. After freeze-drying, the total collagen yield was 39.3%. FTIR analysis revealed the highest collagen peak at Amide A (3280.89 cm<sup>-1</sup>), indicating O-H stretching. Amino acid analysis using HPLC showed L-Leucine as the highest essential amino acid (10.6%), while L-Methionine was the lowest (0.1%). Among non-essential amino acids, L-Glutamic acid was the highest (25.7%), with L-Cystine as the lowest (0.5%). Antioxidant activity was evaluated using DPPH, ABTS, and FRAP assays. The IC<sub>50</sub> values were 91.12 ppm for DPPH and 117.17 ppm for ABTS. The FRAP assay indicated a Trolox equivalent value of 153.90 mmol/g. Antioxidant evaluation via DPPH and ABTS assays showed moderate antioxidant strength, while the FRAP assay indicated strong antioxidant potential.

**Keywords:** Antioxidant; Amino acid; and Collagen

## Abstrak

Teripang *Stichopus horrens*, organisme laut yang memiliki berbagai manfaat kesehatan, khususnya di bidang medis. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi karakterisasi kolagen dan potensi antioksidan *S. horrens*. Metode eksploratif deskriptif digunakan. Sampel *S. horrens* diekstraksi menggunakan NaOH, CH<sub>3</sub>COOH, dan air suling untuk mendapatkan kolagen. Total hasil kolagen setelah pengeringan beku adalah 39,3%. Analisis FTIR menunjukkan puncak kolagen tertinggi pada Amida A 3280,89, yang menunjukkan peregangan OH. Analisis asam amino menggunakan HPLC mengungkapkan L-Leusin sebagai asam amino esensial tertinggi (10,6%) dan L-Metionin sebagai yang terendah (0,1%). Di antara asam amino nonesensial, L-Asam Glutamat adalah yang tertinggi (25,7%), dan L-Sistin terendah (0,5%). Aktivitas antioksidan dinilai menggunakan metode DPPH, ABTS, dan FRAP, dengan nilai IC<sub>50</sub> sebesar 91,12 ppm untuk DPPH dan 117,17 ppm untuk ABTS. Uji FRAP menunjukkan nilai ekuivalen Trolox sebesar 153,90 mmol/g. Uji antioksidan dengan metode DPPH dan ABTS menunjukkan kekuatan antioksidan sedang dan untuk FRAP dalam kategori yang kuat.

**Kata Kunci:** Antioksidan; Asam Amino; dan Kolagen

## PENDAHULUAN

Teripang adalah organisme laut yang dikenal banyak memiliki manfaat kesehatan dan nutrisi. Beberapa tahun terakhir, perhatian terhadap potensi terapi teripang, terutama hasil kolagen dari teripang memiliki peranan penting dalam kesehatan kulit, jaringan, dan penyembuhan luka. Kolagen adalah protein struktural utama yang mendukung elastisitas dan kekuatan jaringan ikat pada tubuh manusia. Penelitian ini menunjukkan kolagen teripang memiliki profil asam amino yang unik, yang mampu memberikan manfaat kesehatan yang signifikan (Kang et al., 2022).

Kolagen adalah protein struktural yang terdapat pada jaringan ikat hewan dan manusia. Secara keseluruhan, terdapat 28 tipe kolagen yang telah teridentifikasi, namun hanya ada 5 jenis tipe kolagen paling umum: kolagen tipe I ditemukan dalam tendon, ligamen dan tulang; kolagen tipe II ditemukan pada tulang rawan dan cakram intervertebralis; kolagen tipe III berasosiasi dengan kolagen tipe I dalam jaringan kulit, pembuluh darah, dan organ internal; kolagen tipe IV pada

membran dasar, yang mendukung epitelium, endotelium, dan jaringan lainnya; kolagen tipe V berperan dalam pembentukan jaringan ikat ekstraseluler dan hadir bersama dengan tipe I di berbagai jaringan (Tharindu *et al.*, 2020). Teripang termasuk dalam kategori kolagen tipe I.

Selain itu, kolagen teripang dikenal mengandung senyawa antioksidan yang mampu membantu stress oksidatif dan kerusakan seluler, yang disebabkan radikal bebas. Aktivitas antioksidan penting dalam mencegah penyakit degeneratif dan penuaan dini (Ahn *et al.*, 2019). Meskipun terdapat banyak penelitian mengenai kolagen dan antioksidan dari berbagai sumber, namun studi khusus mengenai karakterisasi kolagen dan potensi antioksidan dari teripang masih terbatas.

Kolagen teripang, khususnya dari spesies seperti *Stichopus horrens*, memiliki kandungan jumlah komponen bioaktif yang signifikan termasuk kolagen, glikosaminoglikan, dan asam amino. Komponen ini memberikan berbagai macam manfaat bagi kesehatan, terutama sebagai antioksidan, anti-inflamasi, dan efek penyembuhan luka (Shi *et al.*, 2016).

kolagen yang dihasilkan melalui hidrolisis kolagen telah terbukti memiliki aktivitas antioksidan yang kuat, yang dapat membantu dalam melawan radikal bebas dan mengurangi stress oksidatif seperti fukosilasi chondroitin sulfat dan glikosaminoglikan juga dikenal memiliki kemampuan dalam memodulasi respons imun dan memberikan efek antikoagulan (Tharindu *et al.*, 2020).

Antioksidan menggunakan tiga metode berbeda DPPH dan ABTS dengan IC<sub>50</sub> dan FRAP menggunakan Trolox. DPPH mengukur kemampuan antioksidan menghilangkan radikal bebas yang stabil dan dapat mengukur pengurangan warna saat berinteraksi dengan antioksidan. Panjang gelombang yang ditembakkan 517nm untuk melihat antioksidan (Wu *et al.*, 2023). ABTS mengukur kemampuan antioksidan menghilangkan ABTS<sup>+</sup>. ABTS<sup>+</sup> adalah radikal bebas biru-hijau yang dihasilkan dengan mengoksidasi ABTS dengan kalium persulfat, ini dapat dilihat dengan penurunan absorbansi pada panjang gelombang 734nm untuk dapat menunjukkan aktifitas antioksidannya (Miller *et al.*, 2022). FRAP mengukur kemampuan antioksidan untuk mereduksi ion (Fe<sup>3+</sup>) menjadi ion feros (Fe<sup>2+</sup>). Larutan FRAP berwarna biru-merah ini dihasilkan antara ion feros dan reagen FRAP pada pH rendah, jika terdapat antioksidan akan mengubah warna larutan, ini diukur dengan panjang gelombang 593nm (Benzie *et al.*, 2023).

Penelitian ini bertujuan untuk mengeksplorasi dan mendeskripsikan karakteristik kolagen dalam teripang (*Stichopus sp.*) serta menilai potensi antioksidan yang dimilikinya. Dengan memahami profil asam amino, struktur kolagen, dan aktivitas antioksidan, penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi untuk medis dan kosmetik, serta meningkatkan pemanfaatan teripang dalam bidang industri kesehatan.

## MATERI DAN METODE

Materi penelitian ini menggunakan teripang berjenis *Stichopus horrens* kering yang diambil dari kepulauan Riau. Metode penelitian yang digunakan adalah deskriptif eksploratif. Dilakukan pembersihan sampel, kemudian dilakukan ekstraksi menggunakan NaOH 0,1M selama 24 jam diganti 6 jam sekali, Larutan diganti CH<sub>3</sub>COOH 0,5M selama 24 jam, dilakukan pendinginan perendaman dengan aquades di suhu 40°C, untuk menghilangkan sisa larutan Kemudian dilakukan tes uji pH dengan metode AOAC (2005). Hasil ekstraksi di *freezdrying* pada suhu -40°C /-60°C (Nurrachma, 2020). Mengacu pada metode AOAC (2005), pengukuran % pada rendemen kolagen.

FTIR merupakan uji untuk menentukan gugus fungsi menggunakan alat yang disebut dengan FTIR (*Fourier Transform Infrared*). Sahfitri *et al.* (2018), guna untuk menentukan gugus fungsi protein pada kolagen teripang, dilakukan uji menggunakan FTIR pada bilangan gelombang 4000-400 cm<sup>-1</sup>/ 4000-500 cm<sup>-1</sup>, dengan kolagen teripang sebanyak 0,02 g dan 0,1 kalium bromida yang telah dihaluskan menjadi homogen.

Profil As. Amino ini menggunakan metode uji HPLC, metode ini digunakan menganalisis profil As. Amino dan As. Lemak yang terdapat pada ekstrak, Uji menggunakan jenis metode Mikro (AOAC,1970) (Pringgenies *et al.*, 2020). Antioksidan metode DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) diperlukan reagen pembuatan larutan metanol atau etanol senyawa yang memiliki warna ungu tua memiliki elektron tidak berpasangan. Sampel yang memiliki potensi antioksidan ditambahkan kedalam larutan. Jika larutan reagen tereduksi berubah menjadi kuning pucat, diduga terdapat antioksidan, diperlukan pengecekan lebih lanjut dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 517nm. Penghitungan aktivitas antioksidan dihitung berdasarkan penurunan absorbansi, semakin tinggi nilai aktivitas antioksidan dari sampel tersebut. Dilakukan perhitungan nilai % inhibisi radikal DPPH.

Dilakukan plot data inhibisi terhadap konsentrasi antioksidan dalam sampel dan akan didapatkan kurva inhibisi. Maka hasil kurva akan menunjukkan nilai DPPH IC<sub>50</sub> (Sirivibulkovit *et al.*, 2018). Metode ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) digunakan secara luas untuk mengukur kapasitas antioksidan total (TAC). Larutan ABTS berupa reagen dibuat dengan pengoksidasi kalium persulfat untuk menghasilkan radikal ABTS<sup>+</sup>. Larutan disimpan didalam tempat gelap, didiamkan selama beberapa jam agar didapatkan radikal yang stabil. Penentuan kurva kalibrasi diperlukan larutan standar dengan konsentrasi antioksidan yang diketahui, pengukuran nilai absorbansi pada panjang gelombang 734nm, dimana radikal ABTS<sup>+</sup> memiliki puncak serapan maksimum, buat kurva kalibrasi dengan plot absorbansi terhadap konsentrasi. Sampel ditambahkan kedalam uji larutan ABTS<sup>+</sup> dan di ukur pengurangan absorbansinya setelah waktu reaksi tertentu, pengurangan absorbansi ini menunjukkan nilai antioksidan dalam sampel untuk mereduksi radikal ABTS<sup>+</sup>. Analisis data bandingkan perubahan nilai absorbansi sampel dengan kurva kalibrasi untuk menentukan aktivitas antioksidan dalam bentuk IC<sub>50</sub>. Hitungan nilai % inhibisi sama dengan rumus pada DPPH. Hasil akan dilaporkan dalam ekuivalen standar yang digunakan dalam satuan absorbansi per satuan konsentrasi dari antioksidan (Silvestrini *et al.*, 2023).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil rendeman kolagen *Stichopus horrens* didapatkan 39,3% dengan berat bahan baku yang didapatkan 15,04gr dan berat kolagen 5,91gr. Hasil uji FTIR pada Tabel 1. untuk memprediksi kandungan kolagen pada sampel yang terhidrolisis ditemukan peptide kolagen pada puncak gelombang tertentu. Pita amida ini menunjukkan molekul protein termasuk kolagen, ikatan ini menghubungkan asam amino dalam protein. Hasil amida A puncak gelombang yang diperoleh 3280,89cm<sup>-1</sup> pita ini terkait dengan regangan N-H dapat menunjukkan ikatan hidrogen antar molekul dengan puncak standar kolagen 3200-3400cm<sup>-1</sup>. Amida I puncak gelombang yang diperoleh 1637,61cm<sup>-1</sup>, pita amida ini paling penting dalam spektrum FTIR untuk protein, termasuk dalam protein kolagen karena berhubungan dengan regangan C=O dalam ikatan peptida. Pita renggangan karbonil, tanda khas ikatan dalam protein. Ini ditunjukkan dengan ikatan standar puncak kolagen 1600-1690cm (Abidin, 2021). Amida II puncak gelombang yang diperoleh 1538,11cm<sup>-1</sup>, pita ini mencerminkan kombinasi reagent N-H dan C-N ini merupakan ciri khas dari protein, dengan puncak standar kolagen 1600-1500cm<sup>-1</sup> (Abidin, N., 2021).

Amida III puncak gelombang yang diperoleh 1241,00cm<sup>-1</sup>, pita ini mencerminkan vibrasi C-N dan N-H dalam ikatan, memiliki standart panjang gelombang kolagen 1300-1200cm<sup>-1</sup> (Abidin, N., 2021). Uji HPLC pada Tabel 2. didapatkan 18 profil asam amino yang dibagi menjadi dua asam amino essensial dan non essensial. Pembentuk kolagen adalah asam amino non essensial seperti glisin, prolin atau hidrosiprolin, Arginin dan Alanin yang merupakan komponen utama dalam strukturnya. Namun hasil yang didapatkan nilai paling tinggi adalah L-Asam Glutamat 25,9% dan L-Asam Aspartat 22,4%, namun untuk pembentuk kolagen diketahui nilai glisin 14,9%, L-Prolin 10,3%, L-Arginin 12,2% dan L-Alanin 9,5%. L-Asam Glutamat dan L-Asam Aspartat lebih tinggi, kemungkinan sampel mengandung protein lain atau yang kaya akan asam amino. Kedua asam amino non esensial ini memiliki peranan penting dalam banyak protein, terutama sebagai enzimatik dan sinyal seluler, sehingga keberadaan mereka dapat mencerminkan komposisi protein yang berbeda atau

tambahan (Namura *et al.*, 2024). Namun penyebab lain nilai pembentuk kolagen lebih rendah bisa diindikasikan oleh beberapa hal seperti: Komposisi protein campuran bukan kolagen murni tetapi protein dengan campuran proporsi tinggi dari asam amino tersebut; Variasi Struktural ada beberapa jenis kolagen yang memang komposisi asam amino yang berbeda.

**Tabel 1.** Hasil FTIR dari *Stichopus horrens*

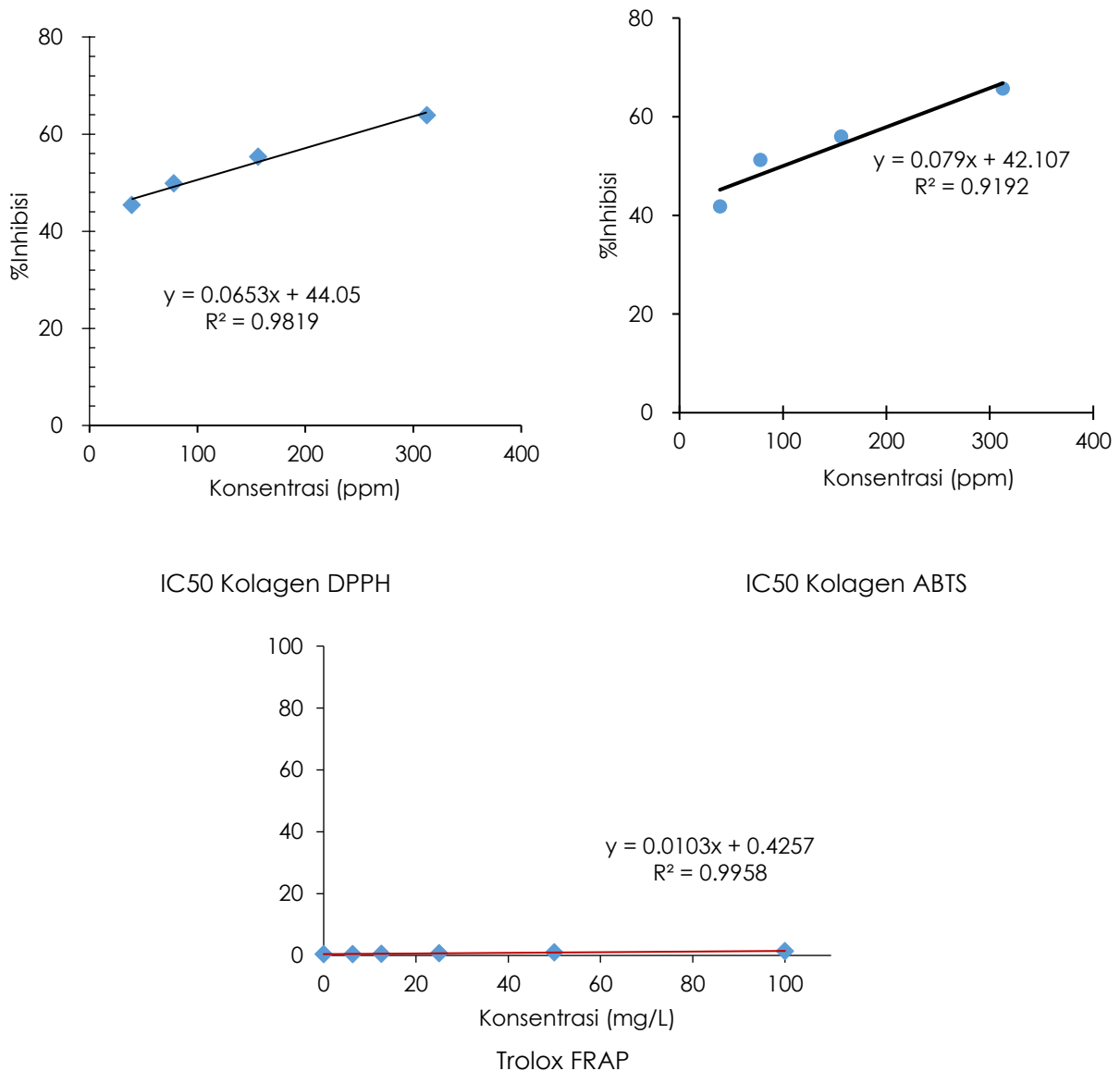
Pita Amida	Puncak Gelombang Didapat (cm <sup>-1</sup> )	Karakteristik Pita	Wilayah Serapan (cm <sup>-1</sup> )	Deskripsi	Refrensi
A	3280,89	(N-H stretching)	3200–3400	Pita yang menunjukkan ikatan hidrogen antar molekul amida.	
I	1637,61	(C=O stretching)	1600–1690	Pita regangan karbonil, tanda khas ikatan peptida dalam protein.	Abidin, 2021
II	1538,11	(N-H bending, C-N)	1500–1600	Pita kombinasi regangan N-H dan C-N.	
III	1241,00	(C-N, N-H bending)	1200–1300	Pita yang terkait dengan ikatan peptida.	

**Tabel 2.** Asam Amino Essensial dan Non Essensial

No	Asam Amino	Hasil Uji
Asam Amino Esensial		
1	L-Histidin	3.0%
2	L-Isoleusin	6.6%
3	L-Leusin	10.6%
4	L-Lisin	8.4%
5	L-Metionin	0.1%
6	L-Triptofan	3.1%
7	L-Valin	8.0%
8	L-Fenilalanin	7.8%
9	L-Treonin	8.5%
Asam Amino Non Esensial		
1	L-Alanin	9.5%
2	L-Arginin	12.2%
3	L-Asam Aspartat	22.4%
4	Glisin	14.9%
5	L-Asam Glutamat	25.7%
6	L-Sistin	0.5%
7	L-Prolin	10.3%
8	L-Serin	9.3%
9	L-Tirosin	6.7%

**Tabel 3.** Hasil uji antioksidan

Metode Uji	Jenis Standart Uji	Nilai Uji	Satuan Nilai Uji	Kategori	Referensi
DPPH	IC <sub>50</sub>	91,12	ppm	Sedang	Liu <i>et al.</i> , 2021
ABTS	IC <sub>50</sub>	117,17	ppm	Sedang	Arno <i>et al.</i> , 2020
FRAP	Trolox	153,90	mg/l	Kuat	Gutteridge & Halliwell, 2022



**Gambar 1.** Hasil Analisa Antioksidan

Berdasarkan ketiga metode uji pada Tabel 3, yang berbeda nilai antioksidan dalam kategori yang kuat. DPPH dan ABTS menggunakan jenis standar uji IC<sub>50</sub> sedangkan untuk FRAP menggunakan standar Kurva Trolox. Menggunakan tiga uji yang berbeda karena setiap metode memiliki standar penyerapan antioksidan yang berbeda. DPPH memiliki kemampuan mengukur senyawa untuk

mereduksi radikal bebas, memberikan gambaran mengenai kemampuannya dalam menangkap radikal bebas secara stabil, kolagen yang memiliki aktivitas DPPH rendah menunjukkan potensi antioksidan yang kuat. ABTS memiliki kemampuan mereduksi radikal kation ABTS, dapat memberikan informasi tambahan tentang potensi antioksidan pada lingkungan yang berbeda, kolagen menunjukan nilai rendah pada nilai ABTS ini termasuk juga dalam kategori yang baik (Silvia *et al.*, 2023). FRAP kemampuan mengukur senyawa untuk mereduksi ion besi ( $Fe^{3+}$ ) menjadi ion besi ( $Fe^{2+}$ ), ini memberikan indikasi kekuatan reduktif suatu senyawa. Untuk melihat nilai kolagen menggunakan kurva Trolox (Yang *et al.*, 2023).

DPPH dengan nilai 91,12ppm, menjelaskan bahwa kolagen memiliki kemampuan yang baik untuk menangkap radikal bebas. Hal ini penting untuk dapat mengurangi stress oksidatif yang dapat merusak sel kulit pada jaringan tubuh, kolagen pada uji DPPH diketahui memiliki asam amino yang dapat mendonorkan elektron, seperti prolin dan hidrokisprolin, yang diketahui sangat efektif untuk mereduksi radikal DPPH. ABTS dengan nilai 117,17ppm mendekati 100 ppm menunjukkan aktivitas antioksidan yang signifikan, yang berarti kolagen dapat berperan dalam melindungi sel dari kerusakan oksidatif dalam berbagai kondisi lingkungan, kolagen pada uji ABTS dapat mengikat dan menetralkan radikal bebas dalam medium air dan lipid, yang relevan untuk produk perawatan kulit (Gutteridge & Halliwell, 2022). FRAP dengan nilai 153,90 mg/l nilai yang dalam skala Trolox Equivalent menunjukan kolagen memiliki kapasitas reduktif yang kuat, kolagen pada uji FRAP kandungan asam amino hidrofobiknya, memiliki kemampuan untuk mendonorkan elektron, ini penting untuk mencegah oksidasi yang disebabkan oleh logam berat (Saïd & Mekelleche, 2021).

Perbedaan  $IC_{50}$  dan Trolox.  $IC_{50}$  (*Half Maximal Inhibitory Concentration*) parameter yang dipergunakan untuk mengukur konsentrasi suatu senyawa yang diperlukan untuk menghambat 50% aktivitas biologis atau kimia tertentu. Dalam uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH dan ABTS ini semakin rendah nilai  $IC_{50}$  semakin kuat antioksidannya, kategori nilai  $IC_{50}$  dapat dilihat sebagai berikut:  $IC_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$  (atau ppm): Senyawa dengan nilai  $IC_{50}$  di bawah  $50 \mu\text{g/mL}$  dianggap memiliki aktivitas antioksidan yang kuat;  $IC_{50} 50\text{--}100 \mu\text{g/mL}$  (atau ppm): Nilai  $IC_{50}$  dalam rentang ini menunjukkan aktivitas antioksidan sedang;  $IC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$  (atau ppm): Aktivitas antioksidan dianggap rendah jika nilai  $IC_{50}$  lebih besar dari  $100 \mu\text{g/mL}$  (Gutteridge & Halliwell, 2022). Trolox adalah senyawa sintetik yang menyerupai vitamin E dan sering digunakan sebagai standar referensi dalam pengukuran aktivitas antioksidan. Penggunaan Trolox memungkinkan peneliti untuk membandingkan potensi antioksidan dari senyawa lain dengan aktivitas yang diketahui dari Trolox. Ini membantu mengkuantifikasi aktivitas antioksidan dalam unit *Trolox equivalent antioxidant capacity* (TEAC), sehingga memberikan kerangka kerja untuk mengevaluasi efisiensi antioksidan dari berbagai ekstrak atau senyawa (Xu, Q., *et al.*, 2020).

Kolagen dengan aktivitas antioksidan yang kuat dapat memberikan berbagai manfaat kesehatan, termasuk perlindungan terhadap kerusakan sel, penuaan dini, dan kondisi inflamasi. Dengan nilai uji yang menunjukkan aktivitas antioksidan yang kuat, kolagen memiliki potensi besar sebagai bahan aktif dalam suplemen kesehatan dan produk perawatan kulit. Penelitian terbaru mendukung penggunaan kolagen untuk mengatasi stres oksidasi dan meningkatkan kesehatan kulit (Micheloni *et al.*, 2023)

## KESIMPULAN

Kandungan kolagen atau dalam teripang *Stichopus horrens* serta manfaat antioksidan dan profil asam aminonya. Kolagen teripang kaya akan protein yang berguna, terutama dalam industri kesehatan. Analisis FTIR mengidentifikasi berbagai gugus fungsi protein pembentuk kolagen. HPLC menunjukkan asam amino non-esensial L-Asam Glutamat (25,7%) ditemukan lebih tinggi dibandingkan pembentuk utama kolagen seperti Glisin (14,9%). Uji antioksidan dengan tiga metode yang berbeda menunjukan nilai yang kuat untuk sampel kolagen teripang sebagai penangkal radikal bebas, bagi kesehatan. Perlunya pengkajian ulang terkait penelitian diatas terutama mengenai uji antioksidan.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abidi, N., (2021). Cartilage, Bone, Collagen, and Biomaterials. *FTIR Microspectroscopy: Selected Emerging Applications*, pp.91-105.
- Ahn, C.B., Lee, H. J., & Cho, S.Y. (2019). Sifat antioksidan kolagen dari teripang (*Stichopus japonicus*) dan potensinya untuk aplikasi makanan. *Antioxidants*, 8(12), 606.
- AOAC. [Association of Official Analytical Chemist]. (1970). Official Methods of Analysis of The Association of Official Analytical Chemists. Washington, D.C.
- AOAC. [Association of Official Analytical Chemist]. (2005). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist. Virginia (US): The Association of Analytical Chemist, Inc.
- Arno, D., Foster, R., & Miller, H. (2020). Comparative analysis of ABTS IC50 in antioxidant assays. *Antioxidants Research Journal*, 12(4), 456-462. doi:10.1155/antiox2020.456789.
- Benzie, I.F.F., & Strain, J.J. (2023). FRAP assay for assessing antioxidant power: Application and advances. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 72(2), 134-142.
- BSN. [Badan Standardisasi Nasional]. (2014). Kolagen kasar dari sisik ikan-Syarat mutu dan pengolahan: SNI 8076-2014. Jakarta (ID): Badan Standardisasi Nasional.
- Gutteridge, J.M.C., & Halliwell, B. (2022). Free radicals and antioxidant activity using FRAP with Trolox equivalency. *Journal of Free Radical Biology*, 33(1), 98-104.
- Kang, M.C., Kim, D.H., Lee, S.H., & Ko, S.C. (2014). Collagen and antioxidant activities from sea cucumber (*Stichopus japonicus*) extracted using various methods. *Food Science and Biotechnology*, 23(2), 645-651.
- Micheloni, O.B., Ramallo, I.A., Christeler, B., Farroni, A.E., & Furlan, R.L.E. (2023). A Cupric Reducing Antioxidant Capacity Assay Coupled to Thin-Layer Chromatography. *Journal of Planar Chromatography-Modern TLC*, 36(5), 367-375. doi: 10.1007/s00764-023-00273-w
- Miller, N.J., & Rice-Evans, C.A. (2022). ABTS Assay for Antioxidant Activity: Methodological Aspects and Applications. *Free Radical Research*, 56(7), 665-680.
- Nomura, K., Kimira, Y., Kobayashi, R., Shiobara, Y., Osawa, Y., Kataoka-Matsushita, A., & Mano, H., (2024). Collagen-Derived Dipeptide Prolyl-Hydroxyproline Cooperates with Foxg1 to Activate The PGC-1 $\alpha$  Promoter and Induce Brown Adipocyte-Like Phenotype in Rosiglitazone-Treated C3H10T1/2 Cells, *Frontiers in Nutrition*, 11, 1375532. doi: 10.3389/fnut.2024.1375532
- Nurrachman, A. (2020). Pengaruh Penambahan Silk Fibroin terhadap Karakteristik Scaffold Dental Gypsum Hydroxyapatite-Gelatin. Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember.
- Pringgencies, D., Indrajati, R.M., & Djunaedi, A. (2020). Study of Nutritional Contents of Sea Urchin Gonad from Drini Beach, Gunung Kidul, Yogyakarta, *Jurnal Kelautan: Indonesian Journal of Marine Science and Technology*, 13(3), 219-227. doi: 10.21107/jk.v13i3.7808
- Said, A.E.H. & Mekelleche, S.M. (2021). Antioxidant Activity of Trolox Derivatives Toward Methylperoxyl Radicals: Thermodynamic and Kinetic Theoretical Study. *Theoretical Chemistry Accounts*, 140(9), p.28. doi: 10.1007/s00214-021-02815-z
- Shi, S., Feng, W., Hu, S., Liang, S., An, N., & Mao, Y. (2016). Bioactive Compounds of Sea Cucumbers and Their Therapeutic Effects. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 34, 549-558. doi: 10.1007/s00343-016-4334-8
- Silvestrini, A., Meucci, E., Ricerca, B.M., & Mancini, A. (2023). Total Antioxidant Capacity: Biochemical Aspects and Clinical Significance. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(13), 10978. doi: 10.3390/ijms241310978
- Silvia, R., Hartono, M., & Prasetyo, T. (2023). Antioxidant potential of collagen measured by ABTS radical cation assay in different environmental settings. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 22(5), 411-419.
- Sirivibulkovit, K., Nouanthavong, S., & Sameenoi, Y. (2018). Based DPPH Assay for Antioxidant Activity Analysis. *Analytical sciences*, 34(7), 795-800. doi: 10.2116/analsci.18P014
- Tharindu, H.N., Madhujith, T., Ranathunga, L., & Wijesekara, I. (2020). Antioxidant properties of collagen-derived peptides: Potential health benefits and applications. *Journal of Food Biochemistry*, 44(10), e13325. doi:10.1111/jfbc.13325.
- Wu, L., Zhang, M., & Yang, M. (2023). Evaluation of Antioxidant Activities Using DPPH Radical Scavenging Assay: A Review of Methods and Applications. *Antioxidants*, 12(4), 892.

- Xu, Q., Zhang, L., Zhan, D., Xia, G., Zhu, J., & Zang, H. (2020). Synthesis and Antioxidant Activity Evaluation of Trolox Derivatives. *Chemistry of Natural Compounds*, 56, 645-650.
- Yang, L., Chen, X., & Zhao, W. (2023). Evaluation of collagen antioxidant capacity using FRAP and Trolox equivalent antioxidant capacity curve. *Journal of Functional Foods*, 15(3), 345-352.