

Bioaktivitas ekstrak batang *Xylocarpus granatum* sebagai anti *black spot* alternatif pada *Litopenaeus vannamei* pasca panen

Lanny Kartikasari, Awik Puji Dyah Nurhayati*, Edwin Setiawan, Dewi Hidayati, Nova Maulidina Ashuri, Noor Nailis Saadah, Farid Kamal Muzaki, Iska Desmawati

Program Studi Biologi, Institut Teknologi Sepuluh Nopember, Surabaya, 50111, Indonesia

*Corresponding author, email: awik.nurhayati@gmail.com

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11/11/2016

Received in revised form 24/02/2017

Accepted 21/09/2017

Keywords:

Black spot

Litopenaeus vannamei

Xylocarpus granatum

DOI: 10.22146/jtbb.16385

ABSTRACT

This research was done to explore bioactivity of *Xylocarpus granatum*'s stem extract as tyrosinase inhibitor for alternative preventing black spot in *Litopenaeus vannamei* postharvest. In this research, extraction of bioactive compound from *X. granatum* stem was done by soaking the stem in 96% methanol for 24h at temperature 29°C. The methanol was evaporated by using rotary evaporator at temperature 50°C. The extract was dilute with distillate water at series of dilutions (10%, 30%, 50%, 70%, 90%, and distillate water as the control), and then immersing *L. vannamei* into *X. granatum*'s stem extract as much as 10ml for 6h, and finally the data analyzing use the Kruskal Wallis test and the Least Significant Difference (LSD) test with the degree of confident 95%. The result showed that *X. granatum*'s stem extract is able to prevent a black spot of *L. vannamei* after harvesting process. Furthermore, concentration of 10 % of extract is an effective concentration for preventing a black spot and the control has black spot 0.0360 – 0.0373 mm².

1. Pendahuluan

Litopenaeus vannamei sebagai komoditas unggulan budidaya perikanan di Indonesia senantiasa dituntut memiliki mutu yang prima. Salah satu kendala yang sering muncul pada pasca panen adalah adanya bintik-bintik hitam (*black spot*) pada ruas abdomen udang. Hal ini menunjukkan adanya proses penurunan mutu yang disebabkan oleh proses oksidasi secara enzimatik (Benjakul, 2005).

Tyrosinase merupakan biokatalisator yang mampu mengatalisis proses perubahan asam amino tirosin menjadi melanin dengan melibatkan oksigen melalui proses hidrosilasi dan oksidasi (Likhitwitayawuid, 2008). Udang hidup aktivitas tyrosinase selalu terkontrol oleh sel melanosit yang berhubungan dengan beberapa keratinosit untuk membentuk unit melanin epidermis. Sel melanosit juga dipengaruhi oleh *melanocyte stimulating hormone* (MSH) dari hipofisis menurut Hunter *et al.* (2003). Kemampuan hipofisis udang mati dalam mengontrol sel melanosit terhadap aktivitas tyrosinase menjadi tidak terkontrol, sehingga terjadi peningkatan intensitas pembentukan melanin (Hunter *et al.*,

2003).

Pencegahan *black spot* secara fisik pada pasca panen yaitu *cephalothorax* udang dihilangkan sehingga menjadi udang *head less*. *Cephalothorax* udang telah diketahui mengandung *polifenoloxidase*, enzim tersebut mampu aktif pada kondisi optimumnya yaitu pH 6 dan suhu 45°C, aktifnya enzim tersebut mengakibatkan timbulnya *black spot* (Gimenez, 2004). Penghilangan kepala udang bertujuan untuk mengurangi jumlah dan aktivitas *polifenoloxidase* selama proses pasca panen (Benjakul, 2005).

Pencegahan *black spot* secara kimia pada proses pasca panen yaitu penambahan asam askorbat pada udang sebagai antioksidan, perendaman udang ke dalam air es yang mengandung 100 ppm natrium bisulfit (NaHSO₃)/sodium bisulfit, perendaman udang ke dalam air es yang mengandung 2 ppm metabisulfit/sodium metabisulfit 2 ppm selama 2 menit, serta pencucian udang dengan air yang mengandung klorin 1-10 ppm (Badan Standarisasi Nasional, 1998).

Sulfit (metabisulfit maupun bisulfit) merupakan bahan

anorganik yang sering digunakan sebagai reduktor untuk memperlambat oksidasi dan mencegah *black spot* (Graillet et al., 1997). Mekanisme bisulfit sebagai reduktor yaitu adanya kompetisi diantara gugus hidroksil bisulfit dan gugus hidroksil asam amino tirosin pada sisi aktif tyrosinase, sehingga terjadi penurunan aktivitas tyrosinase saat hidrosilasi (pengikatan gugus hidroksil) dan saat oksidasi (pengikatan oksigen), akibatnya tidak dapat berkombinasi membentuk dopaquinon (kofaktor tyrosinase). Dopaquinon akan kembali ke bentuk asli berupa fenol dan pembentukan melanin menjadi berkurang (Miget, 2010).

Penggunaan sulfit untuk pencegahan *black spot* pada udang memiliki kekurangan yaitu dapat memicu reaksi alergi pada orang yang sensitif terhadap senyawa tersebut. Reaksi alergi tersebut dapat berupa iritasi mata, gangguan saluran pernafasan, dan gangguan saluran pencernaan (BPOM, 2012). Pencegahan *black spot* secara kimia lebih mudah dilakukan untuk industri skala besar. Adanya efek samping akibat penggunaan senyawa kimia untuk mencegah *black spot* memacu para peneliti untuk melakukan eksplorasi terhadap senyawa bioaktivitas natural yang berfungsi untuk mencegah *black spot*. Penelitian *inhibitor* tyrosinase oleh bioaktivitas ekstrak batang *X. granatum* untuk mencegah *black spot* pada *L. vannamei* pasca panen belum dilakukan. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk membuktikan aktivitas bioaktivitas ekstrak batang *X. granatum* sebagai *inhibitor* tyrosinase untuk mencegah *black spot* pada *L. vannamei* pasca panen.

2. Bahan dan cara kerja

Pengujian anti *black spot* ekstrak batang *X. granatum* dilakukan pada 54 ekor *spotless L. vannamei* hidup (2,5 gr, panjang berkisar 12 cm), berumur 2,5 bulan. Batang *X. granatum* yang digunakan berukuran ± 11 cm x 75 cm (keliling x panjang). Batang tersebut selanjutnya dipotong kecil-kecil secara melintang dan ditimbang untuk mengetahui berat basahnya.

Menurut Hendrawan et al. (2015) proses ekstraksi menggunakan methanol 96% sebagai pelarut. Menurut Lopolisa et al. (2011) perbandingan massa dan volume pada pembuatan ekstrak yaitu 1:6 (1 gr simplisia : 6 ml methanol 96%) selama 1x24 jam. Maserat disaring dengan corong *buchner* yang diberi alas berupa kertas saring, kemudian maserat dievaporasi dengan *rotary* evaporator pada suhu 50° C dan ekstrak berbentuk pasta dimasukkan ke dalam botol kaca yang dilapisi aluminium foil.

Ekstraksi batang *X. granatum* dibuat dengan metode maserasi/perendaman dengan beberapa modifikasi menurut

Hendrawan et al. (2015) dengan beberapa modifikasi. Batang *X. granatum* dibersihkan dengan akuades, dikering-anginkan pada suhu 29°C selama 6 jam. Setelah kering, batang *X. granatum* dipotong kecil-kecil, lalu diblender hingga menjadi simplisia, setelah itu ditimbang berat kering, dan disimpan dalam toples kaca kedap udara.

Ekstrak batang *X. granatum* diencerkan dengan akuades hingga terlarut konsentrasi 10% (K1), 30% (K2), 50% (K3), 70% (K4), 90% (K5), sedangkan sebagai kontrol (K0) digunakan akuades sebanyak 10 mL. *L. vannamei* yang telah diaklimatisasi selama 1x24 jam dijaring dan dimasukkan ke dalam kotak tertutup supaya *L. vananmei* mati. Morfometri setiap *L. vannamei* (tinggi dan lingkaran tubuh), dilakukan dengan diletakkan ke dalam cawan petri, setiap cawan petri diisi 3 ekor *L. vannamei*. *L. vannamei* diuji pada suhu ruang berkisar 29°C selama 6 jam.

Setelah 6 jam perendaman, kemudian *L. vannamei* dicuci dengan air untuk menghilangkan larutan ekstrak, setelah itu *L. vannamei* diamati ada tidaknya *black spot* dan tingkat keparahan timbulnya *black spot* melalui pemberian *score* berdasarkan kategori Manheem et al. (2013) pada (Tabel 1).

Rumus pemberian *score black spot* pada *L. vannamei* (Manheem et al., 2013):

$$\% \text{ score black spot} = \frac{\text{luas total black spot pada 1 ekor } L. \text{ vannamei (mm}^2\text{)}}{\text{luas tubuh 1 ekor } L. \text{ vannamei (mm}^2\text{)}} \times 100\%$$

Tabel 1. Kategori *score black spot* menurut Manheem et al. (2013)

Kode	Nilai Kategori	Keterangan
A	0	tidak ada black spot di tubuh <i>L. vannamei</i>
B	2	ada black spot sebanyak 20% di tubuh <i>L. vannamei</i>
C	4	ada black spot sebanyak 20%-40% di tubuh <i>L. vannamei</i>
D	6	ada black spot sebanyak 40%-60% di tubuh <i>L. vannamei</i>
E	8	ada black spot sebanyak 60%-80% di tubuh <i>L. vannamei</i>
F	10	ada black spot sebanyak 80%-100% di tubuh <i>L. vannamei</i>

Cara untuk mengetahui pengaruh perlakuan pada parameter yang diamati dan untuk menganalisis konsentrasi efektif ekstrak batang *X. granatum*, maka dilakukan pengujian hasil *scoring*. Pengujian yang dilakukan yaitu Kruskal-Wallis dengan $\alpha = 5\%$. Daerah kritis tolak H_0 jika H hitung $\geq H$ tabel χ^2 , [sampel besar, $N > 15$, digunakan tabel χ^2].

3. Hasil dan pembahasan

Penelitian ini dilakukan untuk diketahui pengaruh aktivitas bioaktivitas ekstrak batang *X. granatum* sebagai *anti-black spot* pada *L. vannamei* pasca panen. Data yang diambil berupa luas total *black spot* yang terdapat pada *L. vannamei*, dan dianalisis dengan uji Kruskal Wallis dan uji Perbandingan Berganda.

3.1. Ekstraksi batang *X. granatum*

Berat basah batang *X. granatum* sebanyak 500 gr. Simplisia batang *X. granatum* sebanyak 488,4 gr dimaserasi ke dalam pelarut berupa metanol 96% sebanyak 2.930,4 ml. Ekstrak kasar batang *X. granatum* yang didapat sebesar 95 gr (19,45%) dari proses evaporasi.

Tabel 2. Hasil ekstraksi batang *X. granatum* dengan pelarut metanol 96% .

Berat basah <i>X. granatum</i> (g)	Berat simplisia <i>X. granatum</i> (g)	Berat ekstrak <i>X. granatum</i> (g)
500	488,4	96

3.2. Bioaktivitas ekstrak batang *X. granatum* sebagai *anti-black spot* pada *L. vannamei* pasca panen

Aktivitas ekstrak batang *X. granatum* sebagai pencegah *black spot* pada *L. vannamei* pasca panen dilakukan dengan cara pengukuran luas total *black spot* dan luas tubuh *L. vannamei* setelah 6 jam direndam dalam berbagai konsentrasi ekstrak. Hasil pengamatan bioaktivitasitas disajikan dalam (Tabel 3).

Pada kelompok K0 terdapat *black spot* berkisar 0,0360 – 0,0373 mm² dan mendapat *score* 2. Kelompok K1–K5 (ekstrak batang *X. granatum* konsentrasi 10% – 90%) mampu mencegah *black spot* pada *L. vannamei* pada luas tubuh berkisar 3940,35 mm² – 6637,58 mm² dan mendapat *score* 0. Selain analisis pemberian *score*, aktivitas ekstrak batang *X. granatum* terhadap pencegahan *black spot* pada *L. vannamei* pasca panen juga dilakukan melalui pengamatan anatomi *black spot* dengan *optic lab* perbesaran 40X, hasil pengamatan ditunjukkan oleh (Gambar 1).

Hasil pengamatan melanosit *L. vannamei* menunjukkan perbedaan warna dikarenakan residu ekstrak batang *X. granatum*. Kelompok perlakuan K1–K2 ekstrak dapat dibersihkan dengan mudah melalui pencucian menggunakan air, sehingga hasil anatomi tampak putih. Kelompok perlakuan K3–K5 ekstrak cukup sulit dibersihkan melalui pencucian menggunakan air, dikarenakan larutan ekstrak batang *X. granatum* yang cukup pekat menempel

pada tubuh *L. vannamei*, sehingga hasil anatomi tampak merah. Konsentrasi ekstrak batang *X. granatum* yang tinggi yaitu kelompok perlakuan K3–K5 mempengaruhi kualitas estetika warna udang.

Tabel 3. Bioaktivitas ekstrak batang *X. granatum* (rerata±sdev) sebagai pencegah *black spot* pada *L. vannamei* pasca panen.

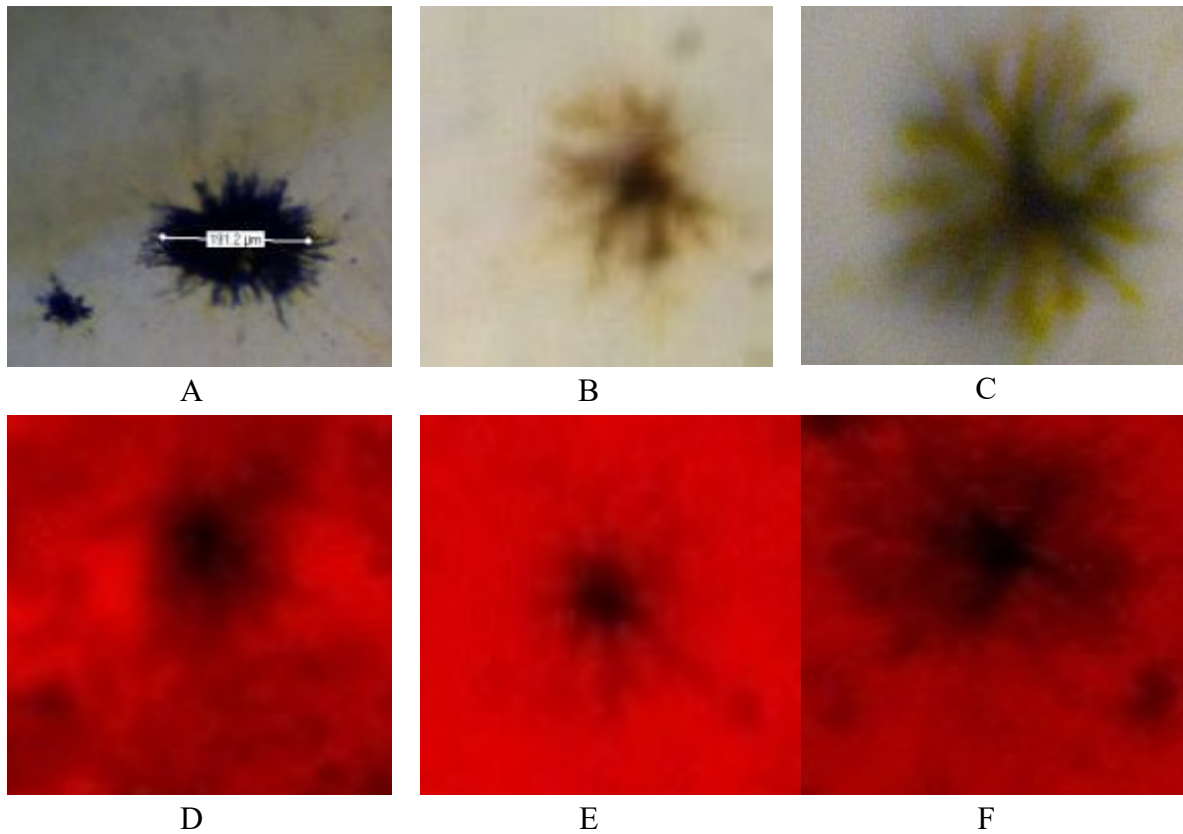
Ke-lompok Perlakuan	Luas <i>black spot</i> (mm ²)	Luas tubuh <i>L. vannamei</i> (mm ²)	Persentase luas <i>black spot</i> terhadap luas tubuh	Kategori Manheem et al. (2013)
K0 (H ₂ O)	0,037 ±0,0007 ^b	6.630,1 ±599,9	0,0006 ±0,000007 ^b	2±0 ^b
K1 (10%)	0±0 ^a	4.760,7 ±573,4	0±0 ^a	0±0 ^a
K2 (30%)	0±0 ^a	4.704,6 ±63,2	0±0 ^a	0±0 ^a
K3 (50%)	0±0 ^a	4.935,9 ±865,7	0±0 ^a	0±0 ^a
K4 (70%)	0±0 ^a	5.539,5±655,4	0±0 ^a	0±0 ^a
K5 (90%)	0±0 ^a	6.203,3 ±495,3	0±0 ^a	0±0 ^a

Keterangan: angka dalam satu kolom yang diikuti huruf berbeda berarti berbeda nyata pada taraf kepercayaan 95%.

Struktur melanin yang mengakibatkan munculnya *black spot* menunjukkan kumpulan melanosom yang menyusun melanin hampir menutupi melanosit dendritik saat berhubungan dengan sel epidermis, sedangkan struktur melanin yang tidak mengakibatkan munculnya *black spot* menunjukkan kumpulan melanosom yang menyusun melanin tidak menutupi melanosit dendritik (Hunter et al., 2003).

Ekstrak batang *X. granatum* berpengaruh terhadap pencegahan *black spot* pada *L. vannamei* pasca panen. Hal ini dibuktikan dengan hasil akhir Uji H sebesar 14,78 lebih besar dari hasil tabel χ^2 sebesar 11,07 dan hasil P value sebesar 0,011 lebih kecil dari hasil α sebesar 0,05, sehingga hasil penelitian menolak H₀ (aktivitas ekstrak batang *X. granatum* tidak dapat mencegah *black spot* pada *L. vannamei* pasca panen).

Hasil Uji Perbandingan Berganda berdasarkan kategori Manheem et al. (2013), di antara kelompok perlakuan pemberian ekstrak batang *X. granatum* menunjukkan bahwa hasil tidak adanya perbedaan secara signifikan, hal tersebut ditunjukkan dengan hasil Uji Perbandingan Berganda berada di selang kepercayaan ($p \leq 0$), sedangkan kelompok perlakuan kontrol (tanpa pemberian ekstrak) menunjukkan bahwa hasil adanya perbedaan secara signifikan, hal tersebut ditunjukkan dengan hasil Uji Perbandingan Berganda berada lebih dari selang kepercayaan (≥ 0).



Gambar 1. Melanosit pada *L. vannamei* dengan pemotretan *optic lab* perbesaran 40X (ekstrak batang *X. granatum* konsentrasi B= 10% (K1), C= 30% (K2), D= 50% (K3), E= 70% (K4), F= 90% (K5), dan A= kontrol berupa akuades (K0)).

3.3. Efektivitas ekstrak batang *X. granatum* sebagai anti-*black spot* pada *L. vannamei* pasca panen

Kelompok K1–K5 ekstrak batang *X. granatum* konsentrasi 10%–90%) mampu mencegah *black spot* pada *L. vannamei* pasca panen. Kelompok K1 merupakan konsentrasi terendah sedangkan kelompok K5 merupakan konsentrasi tertinggi yang dapat mencegah terjadinya *black spot* pada *L. vannamei* pasca panen. Kelompok perlakuan pemberian ekstrak batang *X. granatum* pada masing-masing konsentrasi menunjukkan pengaruh yang sama yaitu mampu mencegah terbentuknya *black spot* pada *L. vannamei* pasca panen.

Keefektifan ekstrak batang *X. granatum* terhadap pencegahan *black spot* pada *L. vannamei* pasca panen yaitu aktivitas bioaktivitas yang terkandung di dalam ekstrak konsentrasi terendah (K1/ekstrak konsentrasi 10%) mampu mencegah *black spot* selama 6 jam pengujian pada *L. vannamei head on*. Kondisi *L. vannamei head on* merupakan kondisi tubuh *L. vannamei* yang masih utuh dan ditandai dengan masih adanya *cephalothorax* udang. *Cephalothorax* udang telah diketahui mengandung *polifenoloxidase*, enzim tersebut mampu aktif pada kondisi optimumnya yaitu pH 6 dan suhu 45°C, aktifnya enzim tersebut mengakibatkan cepat terjadinya penurunan mutu udang berupa timbulnya *black spot* (Gimenez, 2004). Udang *head less* merupakan hasil proses *deheading* (penghilangan *cephalothorax*) yang

bertujuan untuk mengurangi jumlah dan aktivitas *polifenoloxidase* meski pada kondisi optimumnya selama proses pasca panen (Benjakul, 2005).

Ekstrak dibuat dengan metode maserasi (1:6 = massa simplisia : volum pelarut) selama 1×24 jam, lalu dievaporasi dengan *rotary evaporator* pada suhu 50°C. Bioaktivitas yang terdapat pada ekstrak batang *X. granatum* yaitu flavonoid, saponin, tanin dan fenol (Hendrawan *et al.*, 2015). Penelitian lain menunjukkan hasil bahwa proses fraksinasi ekstrak batang *X. granatum* telah terbukti mengandung senyawa kimia organik berupa flavonol yang berperan sebagai *inhibitor tyrosinase* (Lopolisa *et al.*, 2011).

Ekstrak batang *X. granatum* pada penelitian ini masih dalam bentuk ekstrak kasar yang belum difraksinasi. Aktivitas bioaktivitas ekstrak batang *X. granatum* yang terjadi pada penelitian ini diduga adalah senyawa flavonol, sehingga mampu mencegah *black spot* pada *L. vanamei* pasca panen. Hasil penelitian ini berpotensi untuk dikembangkan sebagai *inhibitor tyrosinase* jika selanjutnya dilakukan pemurnian senyawa pada ekstrak kasar batang *X. granatum*.

3.4. Mekanisme bioaktivitas ekstrak batang *X. granatum* terhadap pencegahan *black spot* pada *L. vannamei* pasca panen

Mekanisme pencegahan *black spot* oleh aktivitas

bioaktivitas ekstrak batang *X. granatum*. Bioaktivitas merupakan senyawa metabolit sekunder tumbuhan yang memiliki aktivitas penghambatan terhadap tyrosinase (Chang, 2009). Bioaktivitas tersebut sebagai *inhibitor* tyrosinase sebagai upaya depigmentasi saat sintesis melanin. Depigmentasi bertujuan agar tyrosinase tidak dapat mengoksidasi L-dopa menjadi DOPAquinone karena jumlah produksi DOPAquinone sebagai kofaktor tyrosinase sebanding dengan jumlah produksi melanin (Shosuke, 2003).

Proses pembentukan melanin dapat dihambat melalui antioksidan, *inhibitor* tyrosinase, dan aktivitas hormonal (Min *et al.*, 2004). *Inhibitor* tyrosinase berupa senyawa yang memiliki gugus fungsional dan mirip dengan substrat sehingga terjadi kompetisi dan dapat merusak sisi aktif tyrosinase (Hartanti, 2009). Konsentrasi *inhibitor* tyrosinase yang tinggi mengakibatkan DOPAchrome yang terbentuk semakin berkurang dikarenakan terjadi penurunan aktivitas tyrosinase.

Flavonol sebagai bioaktivitas yang terdapat pada ekstrak batang *X. granatum* berperan sebagai inhibitor kompetitif terhadap tyrosinase. Mekanisme flavonol sebagai inhibitor yaitu adanya kompetisi diantara gugus hidroksil (OH^-) flavonol dan gugus hidroksil (OH^-) asam amino tirosin pada sisi aktif tyrosinase, sehingga terjadi penurunan aktivitas tyrosinase saat hidrosilasi (pengikatan gugus hidroksil) dan saat oksidasi (pengikatan oksigen), akibatnya tidak dapat berkombinasi membentuk dopaquinon (kofaktor tyrosinase). Dopaquinon akan kembali ke bentuk asli berupa fenol dan pembentukan melanin menjadi berkurang (Chang, 2009).

Flavonol yang terdapat di dalam ekstrak batang *X. granatum* berperan dalam hal mereduksi oksigen karena ROS/oksigen reaktif yang berasal dari atmosfer dapat menginduksi proliferasi sel melanosit dan meningkatkan biosintesis melanosom untuk menghasilkan melanin (Graillet *et al.*, 1997).

4. Kesimpulan

Bioaktivitas ekstrak dari batang *X. granatum* mampu mencegah terjadinya *black spot* pada *L. vannamei* pasca panen dan konsentrasi efektif ekstrak batang *X. granatum* yang mampu mencegah *black spot* pada *L. vannamei* pasca panen adalah 10%.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Ibu Dr. Awik Puji Dyah Nurhayati, Dr.rer.nat Edwin Setiawan, M.Sc., dan Aunurohim, DEA selaku Dosen Pembimbing dan Dosen Penguji; petani Tambak Kalisogo di Dusun Cocok, Kecamatan

Jabon, Kota Sidoarjo, Jawa Timur dan para petani Tambak Trunojoyo di Wonorejo, Kota Surabaya, Jawa Timur; para petani mangrove Desa Labuhan, Kecamatan Sepulu, Kabupaten Bangkalan, Madura, Jawa Timur, sehingga dapat terselesaikannya penelitian ini.

Acuan

- Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia, 2012, Sodium Sulfit, Sentra Informasi Keracunan Nasional (SIKerNas), Pusat informasi obat dan makanan, <http://jdih.pom.go.id>, viewed 19 April 2017
- Badan Standarisasi Nasional, 1998, SNI 0648241-1998: Persyaratan residu chlorine pada air minum, Jakarta, <http://sisni.bsn.go.id>, viewed 19 April 2017
- Benjakul, S., Visessanguan, W., and Tanaka, M., 2005, Properties of phenoloxidase isolated from the cephalothorax of *Penaeus japonicus*, *Journal of Food Biochemistry* 29, 470-485.
- Chang, T., 2009, An updated review of tyrosinase inhibitors, *Int. J. Mol. Sci* 10, 2440-2475.
- Gimenez, B., 2004, Characterization of phenoloxidase activity of carapace and viscera from cephalothorax of norway lobster (*Nephrops norvegicus*), CSIC: Madrid.
- Graillet, C.R., Edith, A., Monique, C., Ortonne, J. P., and Robert, B., 1997, Nitric oxide produced by ultraviolet-irradiated keratinocytes stimulates melanogenesis, *J Clin Invest* 99 (4), 635-642.
- Hartanti, L., & Setiawan, H. K., 2009, Inhibitory potential of some synthetic cinnamic acid derivatives towards tyrosinase, *Indo J Chem* 9, 158-168.
- Hendrawan, Zuraida, I., dan Pamungkas, B. F., 2015, Aktivitas antibakteri ekstrak metanol *X. granatum* dari pesisir muara badak, *Jurnal Ilmu Perikanan Tropis* 20(2), 15-22.
- Hunter, J., Savin, J., and Dahl, M., 2003, *Clinical dermatology 3rd edition*, Blackwell Science Ltd: Malden.
- Likhitwitayawuid, K., 2008, Stilbenes with tyrosinase inhibitory activity, *Review Article Current Science* 94(1), 44-52.
- Lopolisa, C., Darusman, L. K., and Batubara, I., 2011, Screening marker component of tyrosinase inhibitor from *X. granatum* stem, *Valensi* 2(3), 409-413.
- Manheem, K., Benjakul, S., Kijroongrojana, K., Faithong, N., and Visessangar, 2013, Effect of precooking times on enzymes, properties, and melanosis of pacific white shrimp during refrigerated storage, *International Aquatic Research, Springer* 5(1), 1-11.
- Miget, R., 2010, *Shellfish handling practices—shrimp and molluscs*, SRAC Publication No. 4902, Texas.
- Min, K. R., Kim, K. S., Ro, J. S., Lee, S. H., Kim, J. A., Son, J. K., and Kim, Y., 2004, Piperlonguminine from *Piper longum* with inhibitory effects on alphanelanocyte-stimulating hormone-induced melanogenesis in melanoma B16 cells. *Planta Med* 70, 1115-1118.
- Shosuke, I., 2003, A chemist view of melanogenesis, *Pigment Cell Res* 16, 230-236.