

Karakteristik Hidrolisat Gelatin Tulang Itik Dengan Enzim Tripsin Sebagai Penghambat Alfa Amilase (α -Amylase Inhibitor)

Characteristics of Duck Bone Gelatine Hydrolysates with Tripsin Enzyme As an Alpha Amylase Inhibitor

M. Habbib Khirzin^{#1}, Mustofa Hilmi^{#2}, Anis U. Prastujati^{#3}, N. Mawardi^{#4}, R. Rahayu^{#5}

[#]*Teknologi Pengolahan Hasil Ternak, Politeknik Negeri Banyuwangi, Jl. Raya Jember Km.13 Labanasem, Kabat, Banyuwangi.*

¹habbibkhirzin@poliwangi.ac.id

²mustofahilmi@poliwangi.ac.id

³anis.usfah@poliwangi.ac.id

⁴nusrotinmawardi@gmail.com

⁵riza.rahayu4@gmail.com

Abstract

Gelatin is extracted from beef or pork. One of the potential sources of gelatin to be developed apart from land base mammalian is from poultry, namely duck bones. Gelatin extraction from duck bones can be carried out by the acid method. Several studies have reported that hydrolysis of gelatin using various types of enzymes will increase its bioactivity, such as antioxidants, antibacterials, and antihyperglycemic (alpha amylase inhibitors). The purpose of this study was to determine the characteristics of duck bone gelatin which hydrolyzed with trypsin enzyme as an alpha amylase inhibitor. This study used nonfactorial completely randomized design (CRD) with different hydrolysis time treatments. Research parameters such as total soluble protein, TCA soluble protein, hydrolysis degree, and alpha amylase inhibitory activity. The results showed that the different treatment times for hydrolysis had a significant effect ($P < 0.05$) on the TCA soluble protein value and the degree of hydrolysis. However, there was no significant effect ($P > 0.05$) on the total dissolved protein. 180 minutes hydrolysis treatment time with a concentration series of 250; 500; 1000; 2000 ppm has inhibitory activity against alpha amylase, respectively, 39.42; 41.75; 44.58; 48.11%. It has IC_{50} value of 2.74 mg / mL. The inhibitory activity was still weaker than the positive control for acarbose.

Keywords— Alpha amylase inhibitor, duck bone gelatin, hydrolysis, trypsin.

I. PENDAHULUAN

Gelatin merupakan suatu jenis protein jaringan ikat yang dihasilkan dari hasil ekstraksi kolagen tulang maupun kulit hewan. Pembuatan gelatin diproses menggunakan larutan basa atau asam kuat [1] das *et al.*, 2017. Gelatin secara umum diekstrak dari sumber sapi maupun babi. Salah satu sumber gelatin yang potensial dikembangkan selain dari mamalia darat adalah dari unggas, yaitu tulang itik. Ekstraksi gelatin dari tulang itik dapat dilakukan dengan metode asam dengan waktu yang relatif cepat [2] Khirzin *et al.*, 2019. Hidrolisis protein

merupakan proses pemecahan protein dengan enzim proteolitik yang menghasilkan produk berupa peptida dan asam amino [3] Haslaniza *et al.*, 2010. Protein di dalam gelatin yang dihidrolisis menggunakan enzim akan meningkat bioaktivitasnya [4] Murray dan Fitzgerald, 2007. Beberapa bioaktivitasnya meliputi antioksidan, antibakteri, dan antihiperqlikemik (penghambat alfa amilase) [5] Vo *et al.*, 2011; Aleman *et al.*, 2013; Prastari *et al.*, 2017.

Alfa amilase merupakan enzim yang berfungsi memecah karbohidrat menjadi gula sederhana dan glukosa. Penghambatan terhadap enzim alfa amilase

dapat berfungsi dalam menurunkan kadar glukosa darah (Lhoret dan Jean, 2004). Penurunan kadar glukosa dalam darah dapat mencegah penyakit diabetes mellitus (kencing manis) [6] Isniati, 2007. Diabetes mellitus yang umum ditemui yaitu diabetes mellitus tipe 1 dan 2. Diabetes mellitus tipe 1 terjadi karena proses autoimun, sel beta pankreas rusak sehingga tergantung pada insulin untuk bertahan sedangkan diabetes mellitus tipe 2 ditandai dengan resisten terhadap insulin [7] Alghadyan, 2011. Salah satu obat yang digunakan sebagai terapi penyakit diabetes adalah acarbose. Acarbose memiliki kemampuan dalam menghambat aktivitas enzim alfa amilase sehingga kondisi hiperglikemik (kadar gula tinggi) pada penderita diabetes dapat dikendalikan.

Acarbose sama seperti halnya obat yang lain memiliki efek samping diantaranya seperti rasa mual, kembung, atau diare [8] Feng *et al.*, 2011. Penggunaan obat antidiabetes menimbulkan efek samping sehingga diperlukan alternatif terapi yang lebih baik. Hidrolisis protein dengan berbagai enzim telah banyak dilaporkan memiliki kemampuan dalam menghambat aktivitas enzim alfa amilase [9] Prastari *et al.*, 2017; [10] Laoufi *et al.* 2017. Hidrolisis gelatin tulang itik menggunakan enzim tripsin diharapkan memiliki aktivitas penghambatan alfa amilase yang baik sehingga dapat dijadikan alternatif pengganti obat komersial. Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengetahui karakteristik hidrolisat gelatin tulang itik dengan enzim tripsin sebagai penghambat aktivitas alfa amilase.

II. MATERI DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Teknologi Pengolahan Hasil Ternak Politeknik Negeri Banyuwangi. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu tulang itik, aquades, NaOH, HCl, enzim tripsin, buffer fosfat pH 7.0, *lowry reagent*, *Bovine Serum Albumine*, Asam trikloroasetat, pati, enzim alfa amilase, dan akarbosa. Peralatan yang digunakan yaitu timbangan analitik, *glassware*, *vortex*, *hotplate stirrer*, *oven*, *centrifuge*, mikropipet, spektrofotometer UV-Vis, dan *waterbath shaker*. Penelitian ini dibagi menjadi 2 tahap yaitu tahap pertama ekstraksi gelatin sedangkan tahap kedua yaitu hidrolisis gelatin.

Ekstraksi gelatin dilakukan berdasarkan metode Jannah *et al.* (2013) dengan sedikit modifikasi. Tulang itik direndam dan direbus dengan aquades selama 1 jam. Selanjutnya tulang direndam dalam NaOH 0.5 M selama 30 menit, lalu direndam dalam HCl 5% selama 24 jam. Tulang dinetralkan dengan aquades lalu diekstraksi pada suhu 70°C dan 80°C selama 2 jam dan dikeringkan. Tahap kedua yaitu hidrolisis gelatin yang dilakukan berdasarkan metode [11] Zhang *et al.* (2013). Satu gram sampel dilarutkan ke dalam 100 ml buffer-fosfat pH 7.0.

Selanjutnya enzim tripsin (1:25) (v/v) ditambahkan ke dalam substrat lalu diinkubasi selama 0; 60; 120; 180; dan 240 menit. Reaksi dihentikan dengan pemanasan lalu didinginkan. Sampel disentrifuse lalu supernatan diambil dan dikeringkan.

A. Parameter Penelitian

1) *Uji Total Protein* [12] Lowry *et al.*, 1951; Sampel diambil sebanyak 0,075 ml lalu ditambah 3,925 ml aquades. Selanjutnya sampel ditambahkan dengan 5,5 ml reagent lowry, divortex lalu diinkubasi selama 15 menit pada suhu kamar. Sampel ditambahkan reagent folin-ciocalteu 0,5 ml, divortex, dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar. Selanjutnya sampel diukur kadar proteinnya dengan dibaca serapannya pada panjang gelombang 750 nm menggunakan spektrofotometer UV Vis. Larutan BSA dengan seri konsentrasi (0., 0,2., 0,4., 0,6., 0,8., 1,0 mg/ml) digunakan sebagai standar protein.

2) *Uji Derajat Hidrolisis (Modifikasi Baharuddin et al, 2016)*; Sampel hidrolisat gelatin sebanyak 2 ml ditambahkan dengan 2 ml TCA 20% untuk menghasilkan 10% fraksi terlarut dan 10% fraksi tidak terlarut TCA. Campuran selanjutnya divortex lalu diinkubasi selama 30 menit. Campuran disentrifugasi dengan kecepatan 4.000 rpm selama 10 menit sehingga terjadi pengendapan. Supernatan yang dihasilkan dianalisis kadar nitrogennya dengan metode Kjeldahl. Derajat hidrolisis dihitung sebagai perbandingan protein terlarut TCA dengan total protein sampel.

3) *Uji Aktivitas Penghambatan Alfa Amilase (Modifikasi Sancheti et al., 2007)*; Tahap pertama yaitu menyiapkan buffer fosfat pH 7,0 sebanyak 400 ml. Serbuk pati 0,05 gr dilarutkan ke dalam 10 ml buffer fosfat pH 7,0 lalu dihomogenkan sebagai substrat enzim. Sampel hidrolisat gelatin sebanyak 0,01 gr dilarutkan kedalam 5 ml buffer fosfat pH 7,0. Enzim alfa amilase 0,05 gr dilarutkan ke dalam 10 ml buffer fosfat. Sampel diambil sebanyak 0,25 ml, substrat diambil sebanyak 0,25 ml, dan enzim diambil sebanyak 0,5 ml. Seluruh bahan kemudian dicampurkan, divortex dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 2 ml DNS dan 2 ml NaOH lalu dipanaskan dengan suhu 90°C selama 5 menit. Aktivitas penghambatan dihitung berdasarkan jumlah glukosa yang dihasilkan. Sampel dibaca serapannya pada panjang gelombang 750 nm menggunakan spektrofotometer UV Vis. Aktivitas penghambatan enzim alfa amilase dinyatakan sebagai persen penghambatan (%).

B. Rancangan Penelitian dan Teknik Analisa Data

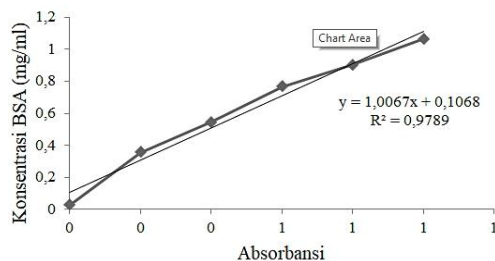
Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan acak lengkap (RAL) pola searah dengan perlakuan lama waktu hidrolisis yang berbeda yaitu 0; 60; 120; 180; 240 menit. Perlakuan diulang

sebanyak 3 kali, sehingga diperoleh 15 unit percobaan. Hasil terbaik dari uji protein total dan derajat hidrolisis akan dilanjutkan dengan uji penghambatan alfa amilase. Data hasil penelitian akan dianalisa menggunakan ANOVA dan apabila terdapat perbedaan yang nyata ($P < 0,05$) maka akan dilanjutkan dengan uji DMRT (*Duncan Multiple Range Test*).

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Uji Total Protein

Uji total protein menunjukkan seberapa besar kandungan protein yang terdapat dalam suatu bahan pangan [13] Ulfah, 2011. Kurva standar protein BSA disajikan pada Gambar 1 sedangkan kadar total protein hidrolisat gelatin tulang itik disajikan pada Tabel 1.



GAMBAR 1. KURVA STANDAR BSA

TABEL 1. TOTAL PROTEIN HIDROLISAT GELATIN TULANG ITIK (MG/ML)

Waktu Hidrolisis	UL 1	UL 2	UL 3	Rata-Rata
0 menit	286,28	272,50	231,01	263,26±28,76
60 menit	341,95	300,60	232,60	291,72±55,21
120 menit	396,02	301,66	269,58	322,42±65,73
180 menit	403,98	312,26	342,35	352,86±46,75
240 menit	433,49	319,15	367,00	373,18±57,37

Hasil uji ANOVA menunjukkan bahwa perbedaan waktu hidrolisis memberikan pengaruh yang tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) terhadap nilai total protein hidrolisat gelatin tulang itik. Persamaan regresi linier $y = 1,006x + 0,106$ dari kurva standar protein BSA digunakan untuk menentukan konsentrasi protein sampel. R^2 menunjukkan nilai 0,9789. Hal ini menunjukkan persamaan regresi linier yang didapatkan memiliki prediksi yang bagus. Uji total protein hidrolisat gelatin tulang itik menunjukkan hasil nilai rata-rata terendah pada perlakuan waktu hidrolisis 0 menit yaitu 263,26 mg/ml, sedangkan nilai rata-rata tertinggi terdapat pada perlakuan waktu hidrolisis 240 menit yaitu 373,17 mg/ml. Konsentrasi protein terus meningkat seiring dengan pertambahan waktu hidrolisis.

Data penelitian menunjukkan bahwa semakin lama waktu hidrolisis, maka kandungan protein yang terdapat pada sampel semakin meningkat. Hal ini sama seperti yang diungkapkan oleh [14] Prastika *et*

al., (2019). Waktu hidrolisis yang semakin meningkat menyebabkan semakin banyak asam amino bebas yang terlepas ke dalam sampel hidrolisat. Ikatan peptida antar asam amino selama proses hidrolisis semakin banyak yang terputus. Protein kompleks pada sampel terpecah menjadi molekul protein yang lebih sederhana.

Hasil dari kadar protein juga dipengaruhi oleh enzim yang digunakan pada saat proses hidrolisis. Penelitian ini menggunakan enzim tripsin. Tripsin mempunyai spesifitas pemotongan ikatan rantai polipeptida pada gugus karboksil L-arginin dan L-lisin, sehingga hidrolisat yang dihasilkan akan mengandung lisin dalam jumlah yang lebih besar dibandingkan apabila menggunakan enzim lain [15] Ekantari *et al.*, 2005. Kandungan protein hidrolisat gelatin tulang itik lebih tinggi dibandingkan dengan penelitian [16] Baehaki *et al.* (2015), yang menyatakan bahwa protein ikan patin yang dihidrolisis menggunakan enzim papain memiliki kadar total protein berkisar antara 20,86 mg/ml sampai 54,47 mg/ml.

B. Derajat Hidrolisis (DH)

Derajat hidrolisis ditentukan dengan metode *soluble* SN-TCA [17] Rutherford, 2010. Nilai kadar protein hidrolisat gelatin tulang itik yang terlarut dalam TCA disajikan pada Tabel 2.

TABEL 2

Waktu Hidrolisis	Derajat Hidrolisis (%)			Rata-Rata
	UL 1	UL 2	UL 3	
0 menit	12,66	11,47	12,25	12,13±0,61 ^a
60 menit	13,72	16,22	15,96	15,30±1,37 ^b
120 menit	18,27	16,22	18,35	17,61±1,21 ^c
180 menit	20,37	20,35	19,51	20,07±0,49 ^d
240 menit	22,32	19,67	19,92	20,64±1,46 ^d

Keterangan: Superskrip (a,b,c,d) yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$).

Hasil uji ANOVA menunjukkan bahwa perlakuan waktu hidrolisis memberikan pengaruh yang nyata ($P < 0,05$) terhadap nilai derajat hidrolisis gelatin tulang itik. Derajat hidrolisis hidrolisat gelatin tulang itik terendah terdapat pada waktu hidrolisis 0 menit yaitu sebesar 12,13%, sedangkan derajat hidrolisis tertinggi terdapat pada waktu hidrolisis 240 menit yaitu sebesar 20,64%. Waktu hidrolisis yang berbeda memiliki notasi superskrip yang berbeda kecuali perlakuan waktu hidrolisis 180 menit dan 240 menit. Semakin lama waktu hidrolisis maka nilai derajat hidrolisis semakin meningkat, akan tetapi saat waktu hidrolisis mencapai 180 menit nilai DH tidak mengalami perubahan yang signifikan.

Peningkatan derajat hidrolisis disebabkan adanya peningkatan pemutusan ikatan peptida dan asam amino yang terlarut dalam TCA akibat pemutusan ikatan peptida selama hidrolisis berlangsung [18] Prastika *et al.*, 2019. Derajat hidrolisis dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya jenis enzim,

substrat, pH, waktu, dan suhu hidrolisis yang digunakan [19] Dumay *et al.*, 2006. Hidrolisis gelatin tulang itik pada penelitian ini menggunakan enzim tripsin. Tripsin memotong ikatan peptida menjadi asam amino lisin dan arginin [20] Arniah, 2017. Substrat protein dari berbagai sumber yang dihidrolisis dengan enzim protease memiliki nilai derajat hidrolisis yang bervariasi. Protein kacang gude yang dihidrolisis dengan enzim pepsin memiliki derajat hidrolisis sebesar 23,59% [21] Prastika *et al.*, 2019. Protein kulit ayam broiler yang dihidrolisis dengan enzim papain memiliki derajat hidrolisis sebesar 18,09% (Puspawati *et al.*, 2020). Kolagen ikan salmon yang dihidrolisis dengan enzim tripsin memiliki DH 53,1% [22] Han *et al.*, 2011.

C. Uji Aktivitas Penghambatan Alfa Amilase

Pengujian penghambatan alfa amilase dilakukan untuk mengetahui penurunan aktivitas enzim alfa amilase dalam memecah pati. Semakin banyak glukosa yang dihasilkan dari sebuah pati artinya semakin banyak pati yang terhidrolisis menjadi glukosa [23] Fitrianiingsih *et al.*, 2016. Sampel yang diuji aktivitas penghambatannya adalah sampel dengan nilai derajat hidrolisis yang tinggi yaitu perlakuan waktu hidrolisis 180 menit karena secara statistika perlakuan 240 menit memiliki notasi yang sama dengan perlakuan 180 menit. Persen aktivitas penghambatan alfa amilase hidrolisat gelatin tulang itik disajikan pada Tabel 3.

TABEL 3
AKTIVITAS PENGHAMBATAN ALFA AMILASE HIDROLISAT GELATIN TULANG ITIK (%)

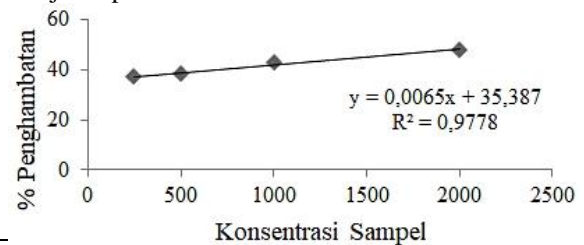
Konsentrasi sampel	Aktivitas Penghambatan			Rata-Rata
	UL 1	UL 2	UL 3	
250	36,90	38,98	42,38	39,42±2,76 ^c
500	38,06	42,35	44,84	41,75±3,43 ^{bc}
1000	43,03	43,81	46,91	44,58±2,06 ^{ab}
2000	48,07	46,90	49,36	48,11±1,23 ^a

Keterangan: Superskrip (a,b,c,d) yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata (P<0,05).

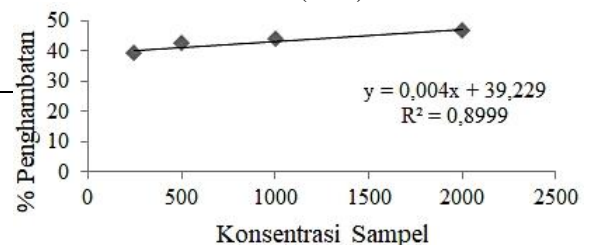
Hasil uji ANOVA menunjukkan bahwa perbedaan konsentrasi sampel yang digunakan berpengaruh nyata (P<0,05) terhadap aktivitas penghambatan alfa amilase. Hasil penelitian menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi hidrolisat gelatin tulang itik maka semakin besar juga nilai persen aktivitas penghambatannya. Menurut [24] Hardoko *et al.* (2015), persen penghambatan menunjukkan jumlah persentase enzim alfa amilase yang dihambat oleh konsentrasi sampel, sehingga semakin besar nilai persen menunjukkan semakin besar penghambatannya terhadap enzim alfa amilase. Persen penghambatan terendah terdapat pada sampel dengan konsentrasi 250 ppm yaitu sebesar 39,42%, sedangkan persen penghambatan tertinggi terdapat pada sampel dengan konsentrasi 2000 ppm yaitu sebesar 48,11%.

Beberapa riset melaporkan protein ikan gabus yang dihidrolisis dengan enzim bromelin memiliki aktivitas penghambatan sebesar 29% [25] Prastari *et al.*, 2017. Ekstrak methanol daun *Tithonia diversifolia* memiliki aktivitas penghambatan sebesar 17,28% pada konsentrasi sampel 500 ppm, sedangkan kontrol positif berupa obat acarbose memiliki aktivitas penghambatan sebesar 60,09% [26] Fitrianiingsih *et al.*, 2016. Senyawa penghambat Alfa amilase telah diteliti memiliki kemampuan menghambat enzim alfa amilase pankreas manusia sehingga dapat dimanfaatkan untuk terapi kegemukan dan pengobatan penyakit diabetes melitus tipe 2 [27] Wahyuntari, 2011.

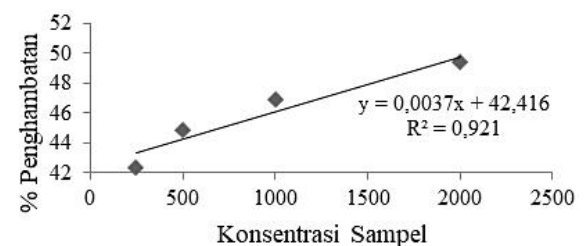
Hasil nilai persen penghambatan dari 4 seri konsentrasi sampel digunakan untuk membuat persamaan regresi linier untuk menentukan nilai *inhibition concentration* 50 (IC₅₀) sampel. Grafik penentuan persamaan regresi linier dari ketiga ulangan disajikan pada Gambar 2,3, dan 4. Persamaan regresi linier terdapat koefisien y sebagai IC₅₀, sedangkan koefisien x pada persamaan ini adalah konsentrasi hidrolisat gelatin tulang itik, dimana konsentrasi tersebut merupakan konsentrasi hidrolisat gelatin tulang itik yang dapat menghambat 50% aktivitas enzim alfa amilase. Nilai IC₅₀ disajikan pada Tabel 4.



GAMBAR 2. GRAFIK PENENTUAN PERSAMAAN REGRESI LINIER (UL 1)



GAMBAR 3. GRAFIK PENENTUAN PERSAMAAN REGRESI LINIER (UL 2)



GAMBAR 3. GRAFIK PENENTUAN PERSAMAAN REGRESI LINIER (UL 3)

TABEL 4

NILAI IC ₅₀ HIDROLISAT GELATIN TULANG ITIK (PPM)			
Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Rata-rata
2248,15	2692,75	2049,73	2470

Hasil penelitian menunjukkan bahwa gelatin tulang itik yang dihidrolisis dengan enzim tripsin selama 180 menit menunjukkan aktivitas penghambatan alfa amilase dengan nilai rerata IC₅₀ yaitu 2470 ppm atau 2,47 mg/ml. Hal ini bermakna bahwa untuk menghambat 50% aktivitas enzim alfa amilase dibutuhkan hidrolisat gelatin tulang itik sebanyak 2,47 mg/ml. Acarbose yang merupakan obat antidiabetes (kontrol positif) memiliki IC₅₀ sebesar 0,326 mg/ml [28] Fitrianiingsih *et al.*, 2016. Semakin kecil nilai IC₅₀ menunjukkan aktivitas penghambatan semakin tinggi dan semakin baik [29] Meila dan Noraini, 2017. [30] Admassu *et al.* (2018) menyatakan protein rumput laut yang dihidrolisis menggunakan pepsin memiliki nilai IC₅₀ sebesar 1,86 mg/mL. Senyawa yang mampu menghambat alfa amilase dapat berasal dari sumber protein maupun non-protein. Sumber protein nabati yang telah banyak diteliti memiliki aktivitas tersebut seperti kacang kedelai *Glycine max* [31] Wahyuntari dan Tekol, 2012.

IV. KESIMPULAN

Kesimpulan dari penelitian ini yaitu perlakuan gelatin tulang itik yang dihidrolisis dengan waktu yang berbeda-beda berpengaruh nyata ($P < 0,05$) terhadap nilai protein terlarut TCA dan derajat hidrolisis. Akan tetapi tidak berpengaruh nyata ($P > 0,05$) terhadap total protein terlarut. Perlakuan waktu hidrolisis 180 menit dengan seri konsentrasi 250; 500; 1000; 2000 ppm memiliki aktivitas penghambatan terhadap alfa amilase berturut-turut sebesar 39,42; 41,75; 44,58; 48,11 % dengan nilai IC₅₀ sebesar 2,74 mg/mL. Daya hambatnya masih lebih lemah dibandingkan kontrol positif akarbose.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Jenderal Riset dan Pengabdian masyarakat (DRPM) Pendidikan Tinggi Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan yang telah memberikan dana penelitian dalam kerangka program penelitian dosen pemula tahun 2020.

DAFTAR PUSTAKA

[1] Admassu, H., M. Abdalbasit, Gasmala, R. Yang, W. Zhao. 2018. Evaluation of the in vitro α -amylase enzyme inhibition potential of commercial dried layer (*Porphyra species*) seaweed protein hydrolysate. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 18: 547-556. DOI: 10.4194/1303-2712-v18_4_06.

[2] Aleman A., M.C. Gomez-guillen, and P. Montero. 2013. Identification of ace-inhibitory peptides from

squid skin collagen after *in vitro* gastrointestinal digestion. *Food Research International*. Vol 54:790-795. DOI: [10.1016/j.foodres.2013.08.027](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.08.027).

[3] Alghadyan, A.A. 2011. Diabetic retinopathy-an update. *Saudi Journal of Ophthalmology*. 25 : 99-111.

[4] Arniah, A. 2017. Uji kadar protein total pada campuran kacang kedelai (*Glycine max* L. Merr) dan ekstrak buah nanas (*Ananas comosus*) dengan perbandingan berbeda. Program Studi Diploma III Analisis Kesehatan. Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Insan Cendekia Medika. Jombang.

[5] Baehaki, A., Shanti, D.L., dan Achmad, R.R. 2015. Hidrolisis protein ikan patin menggunakan enzim papain dan aktivitas antioksidan hidrolisatnya. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 18(3) : 108-117.

[6] Baharrudin, N.A., Halim, N.R.A., dan Sarbon, N.M. 2016. Effect of degree of hydrolysis (dh) on the functional properties and angiotensin i-converting enzyme (ace) inhibitory activity of eel (*monopterus sp*) protein hydrolysate. *International Food Research Journal*. 23(4) : 1424-1431.

[7] Das, M.P., P.R. Suguna., K. Prasad., J.V. Vijaylakshmi., M. Renuka. 2017. Extraction and Characterization of Gelatin: A Functional Biopolymer. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 9(9): 239-242.

[8] Dumay, J., C. Donnay-moreno, G. Barnathan, P. Jaouen and Berge. 2006. Improvement of lipid and phospholipid recoveries from sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using industrial proteases. *Process Biochemistry*. Vol41:2327-2332. DOI: 10.1016/j.procbio.2006.04.005.

[9] Ekantari, N., Santoso, U., dan Hadiwiyoto, S. 2005. Optimasi pembuatan hidrolisat protein dari daging cucut (*Carcharinus sp.*) menggunakan viscera dan tripsin. *Agrosains*. 18(3) : 327-341.

[10] Feng, J., Yang, X.V., dan Wang, R.F. 2011. Bio-assay guided isolation and identification of α -glucosidase inhibitors from the leaves of aquilaria sinensis. *Phytochemistry*. 72 : 242-247.

[11] Fitrianiingsih, S.P., I. T. Maulana., R. Choesrina., D. Dwiputri., dan R. Apriliani. 2016. Uji aktivitas penghambatan alfa amilase ekstrak daun tithonia diversifolia secara in vitro. *Prosiding Seminar Nasional Penelitian dan PKM kesehatan*. 4(1): 108-115.

[12] Han, S.H., Y. Uzawa, T. Moriyana and Y. Kawamura. 2011. Effect of collagen and collagen peptides from bluefin tuna abdominal skin on cancer cells. *Health*. Vol 3(3):129-134. DOI:10.4236/health.2011.33024.

[13] Hardoko, Agnes, F., dan Titri, S. 2015. Aktivitas antiabet secara in vitro agar-agar, agarosa, dan agaropektin dari rumput laut *Gracilaria gigas*. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 18(2) : 128-139.

[14] Haslaniza, H., Maskat, M.Y., Wan Aida, W.M., dan Mamot, S. 2010. The effects of enzyme concentration, temperature and incubation time on nitrogen content and degree of hydrolysis of protein precipitate from cockle (*Anadara granosa*) meat

- wash water. International food research journal. 17 : 147-152.
- [15] Isniati. 2007. Hubungan tingkat pengetahuan penderita diabetes melitus dengan keterkendalian gula darah di Poliklinik RS Perjan Dr. M. Djamil padang tahun 2003. Jurnal Kesehatan Masyarakat. 1(2) : 73-77.
- [16] Khirzin, M.H., S. Ton., Fatkhurrohman. 2019. Ekstraksi dan Karakterisasi Gelatin Tulang Itik dengan metode Ekstraksi Asam. Jurnal Sain Peternakan Indonesia, 14(02): 119-127.
- [17] Lhoret, R.R., dan Jean, L.C. 2004. Alpha glucosidase inhibitors, 3th edition. UK: John Wiley dan Sons Ltd.
- [18] Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., dan Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. Biochemical. 193(1) : 265-275.
- [19] Meila, O., dan Noraini. 2017. Uji aktivitas antidiabetes dari ekstrak metanol buah kiwi (*Actinidia deliciosa*) melalui penghambatan aktivitas α -glukosidase. Jurnal Farmasi Galenika. 3(2) : 132-137.
- [20] Murray, B.A., dan Fitzgerald, R.J. 2007. Angiotensin i-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins: biochemistry, bioactivity and production. Current Pharmaceutical Design Journal. 13(8) : 773-791.
- [21] Prastari, C., Sedarnawati, Y., dan Mala, N. 2017. Karakteristik protein ikan gabus yang berpotensi sebagai antihyperglisemik. Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia. 20(2) : 413-423.
- [22] Prastika, H.H., Ketut, R., Ni Made, P., dan A.A.I.A. Mayun, L. 2019. Penggunaan enzim pepsin untuk produksi hidrolisat protein kacang gude (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) yang aktif antioksidan. Indonesian E-Journal of Applied Chemistry. 7(2) : 180-188.
- [23] Puspawati, N.M., Dewi, P.P., Bogoriani, N.W., dan Ariati, N.K. 2020. Produksi hidrolisat protein antioksidan melalui hidrolisis enzimatik protein kulit ayam broiler dengan enzim papain. Jurnal Kimia. 14(2) : 206-212.
- [24] Rutherford, S.M. 2010. Methodology for determining degree of hydrolysis of protein hydrolysates: a review. Journal of AOAC International. 93(5) : 1515-1522.
- [25] Sancheti, S., dan Seo, S.Y. 2007. Chaenomeles sinensis: a potent alpha and betha glucosidase inhibitor. American Journal of Pharmacy and Toxicology. 4 : 8-11.
- [26] Ulfah, M. 2011. Pengaruh konsentrasi larutan asam asetat dan lama waktu perendaman terhadap sifat-sifat gelatin ceker ayam. Agritech. 31(3) : 161-167.
- [27] Vo, T.S., D.H. Ngo, J.A. Kim, B. Ryu and S.K. Kim. 2011. An antihypertensive peptide from tilapia gelatin diminishes free radical formation in murine microglial cells. Journal of Agriculture and Food Chemistry. Vol 59(22):12193-12197. DOI:10.1021/jf202837.
- [28] Wahyuntari, B. 2011. Penghambat α -amilase: jenis, sumber, dan potensi pemanfaatannya dalam kesehatan. Jurnal Teknologi dan Industri Pangan. 12(2) : 197-201.
- [29] Wahyuntari, B., M.N. Tekol. 2012. Isolation of alpha amylase inhibitors from mungbean and soybean and inhibitory effect of human salivary and porcine pancreatic amylase. *Jurnal sains dan teknologi Indonesia*. Vol 14 (1): 12-16.
- [30] Zhang, Y., Karsten, O., Alberto, G., dan Jeanette, O. 2013. Effect of pretreatment on enzymatic hydrolysis of bovine collagen and formation of ace-inhibitory peptides. 141(3) : 2343-2354.