

Efek Enzim Bromelin Buah Nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr) Berbasis Sediaan Gel terhadap Lebar Intertubulus Dentin

(Effect of Bromelain Pineapple Enzyme (*Ananas comosus* (L.)
Merr) Gel-Based against the Width of Intertubulus Dentin)

Retno Dewi Alfiyanti, Berlian Prihatiningrum, Roedy Budirahardjo

Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember

Jln. Kalimantan 37, Jember 68121

Email: retnodewi2929@gmail.com

Abstract

Caries tissue cleaning can use Chemo-Mechanical Caries Removal (CMCR) based on proteolytic enzymes that catalyze peptide bonds into simpler compounds. Proteolytic enzymes can be found in mature pineapple bromelain enzymes. The aim of the study is to determine the effect of gel-based bromelain enzyme with concentrations of 8%, 10% and 12% against the width of the intertubulus dentin. The bromelain enzyme is extracted using the Lowry method. Then purified using 80% ethanol and diluting become to concentrations of 8%, 10% and 12%. Diluted bromelain enzymes were formed in gel preparations based on HPMC and applied to the study sample. The results of this study indicated a widening of the intertubulus dentin. This is indicated by the variation of the dentin intertubulus width $> 2\mu\text{m}$. This widening occurs because the bromelain enzyme can hydrolyze collagen in intertubulus dentin in the absence of alpha-1-antitrypsin. Hydrolysis causes the breaking of hydrogen bonds in the triple helix-shaped tropocollagen to turn into strands of polypeptide chains. The bromelain enzyme with a concentration 10% is more effective than 8% and 12% because it is within the maximum speed limit of the enzyme so that the enzyme is saturated by its substrate and there is a difference in specific enzyme activity in each concentration.

Keywords: Caries, CMCR, Bromelain, Dentin, HPMC

Abstrak

Pembersihan jaringan karies dapat menggunakan Chemo-Mechanical Caries Removal (CMCR) berbahan dasar enzim proteolitik yang mengkatalis ikatan peptida menjadi senyawa yang lebih sederhana. Enzim proteolitik dapat ditemukan pada buah nanas matang yaitu enzim bromelin. Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji efek enzim bromelin berbasis sediaan gel dengan konsentrasi 8%, 10% dan 12% terhadap lebar intertubulus dentin. Enzim bromelin diekstrak menggunakan metode Lowry. Kemudian di murnikan menggunakan etanol 80% dan diencerkan menjadi konsentrasi 8%, 10% dan 12%. Enzim bromelin yang telah diencerkan dibentuk dalam sediaan gel dengan basis HPMC dan diaplikasikan pada sampel penelitian. Hasil penelitian ini menunjukkan adanya pelebaran pada intertubulus dentin. Hal ini ditunjukkan dengan adanya variasi lebar intertubulus dentin $> 2\mu\text{m}$. Pelebaran ini terjadi karena enzim bromelin ini dapat menghidrolisis kolagen pada intertubulus dentin karena tidak adanya alpha-1-antitripsin. Hidrolisis menyebabkan pemutusan ikatan hidrogen pada tropokolagen semula berbentuk *triple helix* berubah menjadi untaian rantai polipeptida. Enzim bromelin dengan konsentrasi 10% lebih efektif dibandingkan 8% dan 12% karena sudah dalam batas kecepatan maksimum enzim sehingga enzim jenuh oleh substratnya dan adanya perbedaan aktivitas spesifik enzim pada tiap konsentrasi.

Kata kunci : Karies, CMCR, Bromelin, Dentin, HPMC

Pendahuluan

Kesehatan gigi dan mulut yang seringkali tidak diperhatikan adalah masalah karies. Data Riskesdas tahun 2018 menunjukkan prevalensi gigi berlubang pada anak usia dini sangat tinggi yakni 93% [1]. Karies gigi adalah proses perusakan yang menyebabkan dekalsifikasi enamel gigi dan berkelanjutan menjadi kerusakan enamel serta dentin pada gigi [2]. Pembersihan jaringan karies dapat dilakukan dengan beberapa metode antara lain, ekskavasi manual, instrumen berotasi menggunakan bur dan handpiece, abrasi udara, ultrasonik, sonoabrasi dan laser. Namun metode-metode tersebut memiliki banyak kekurangan jika diaplikasikan pada pasien anak. Kekurangan metode-metode tersebut antara lain, tidak efisien waktu, dapat menimbulkan rasa nyeri dan tidak nyaman, bising, pengambilan jaringan karies berlebihan, dan biaya yang cukup mahal. Metode Chemo-Mechanical Caries Removal (CMCR) dapat menjadi alternatif dalam pembersihan karies. Bahan CMCR yang digunakan biasanya menggunakan enzim proteolitik, yaitu enzim yang mengkatalis ikatan peptida menjadi senyawa yang lebih sederhana seperti dipeptida dan asam amino [3].

Nanas bukan merupakan tanaman asli Indonesia namun berasal dari Amerika tropis, yakni Brasil, Argentina dan Peru. Nanas kaya akan vitamin A dan C yang bersifat antioksidan. Selain itu juga mengandung cukup banyak serat, kalsium, fosfor, zat besi, kalium, gula buah (sukrosa) serta enzim bromelin, suatu enzim protease yang bekerja sebagai pemecah protein. Enzim bromelin pada tanaman nanas dapat ditemukan pada bagian kulit, mahkota, daun, batang, bonggol dan daging buah nanas namun aktivitas enzim lebih banyak di bagian daging buahnya [4]. Kandungan bromelin pada jaringan yang belum matang terutama yang bergetah, sangat sedikit sekali bahkan kadang-kadang tidak adasama sekali [5]. Efektivitas enzim bromelin akan lebih stabil jika dalam bentuk sediaan gel. Sediaan berbasis gel bersifat biokompatibel dan mudah diaplikasikan pada daerah kerja [6].

Kemampuan enzim proteolitik sebagai bahan CMCR biasanya bekerja pada karies media. Karies ini sudah menginfeksi bagian dentin gigi. Secara komposisi dentin terdiri dari 45-50% kristal hidroksiapatit (anorganik), 30% zat organik dan 20-25% air. Persentase bahan organik sebagian besar terdiri dari 90%

kolagen tipe I dan sisanya (10%) non kolagen protein seperti fosfoproteins dan proteoglikan [7]. Intertubulus dentin terdiri atas jaringan kolagen dengan ketebalan normal sebesar ≤ 2 μm . Kolagen (C102H149N31O38) merupakan protein fibrilar yang terdiri dari tiga rantai polipeptida (triple helix). Tiga rantai polipeptida ini sama panjang dengan membentuk struktur heliks hingga membentuk molekul dasar kolagen yang disebut tropokolagen [8]. Bahan dasar CMCR biasanya menggunakan enzim proteolitik dengan konsentrasi 10% [9].

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efek enzim bromelin buah nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr) berbasis sediaan gel dengan konsentrasi 8%, 10% dan 12% terhadap lebar intertubulus dentin. Intertubulus dentin yang semakin melebar pada jaringan dentin yang rusak diharapkan dapat menghidrolisis jaringan kolagen yang rusak sehingga nantinya jaringan dentin yang rusak akibat karies dapat terdegradasi dan hanya meninggalkan jaringan dentin yang sehat.

Metode Penelitian

Penelitian ini berlangsung selama 2 bulan dengan menggunakan jenis penelitian eksperimental laboratoris dan rancangan penelitian berupa *post test only control group design*. Tempat penelitian ini di LIPI Kebun Raya Purwodadi untuk identifikasi tanaman nanas, Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember untuk pembuatan ekstrak enzim bromelin tanaman nanas, Laboratorium Kedokteran Gigi Terpadu Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember untuk pemotongan sampel gigi dan di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember untuk pengamatan lebar intertubulus dentin.

Penelitian ini diawali dengan tahap persiapan sampel. Elemen yang digunakan dalam penelitian adalah gigi premolar pertama rahang atas yang memenuhi kriteria sampel dibersihkan dan dibilas dengan aquades dan dikeringkan. Elemen gigi dipreparasi dengan menggunakan bur silindris sedalam 2,5 mm (setengah dentin) pada fissure central dan lebar 2 mm untuk mengondisikan seperti karies media. Sampel gigi yang telah terdapat kavitas kemudian dipotong melalui lesi pada bidang longitudinal mesio-distal menggunakan safeside separating disk [9].

Tahap selanjutnya yaitu isolasi ekstrak enzim bromelin berdasarkan modifikasi metode

Lowry. Buah nanas yang sesuai kriteria dibersihkan, dipotong-potong kemudian dihomogenisasi dengan bufer fosfat pH 7 sedikit demi sedikit sebanyak 1:1. Larutan yang diperoleh disentrifugasi pada 3000 rpm selama 15 menit pada suhu 15°C. Selanjutnya supernatan dipisahkan dari endapannya. Supernatan yang diperoleh merupakan ekstrak kasar enzim bromelin [6]. Setelah itu tahap pemurnian ekstrak enzim bromelin dengan cara mempresipitasi ekstrak kasar enzim menggunakan etanol 80% dengan perbandingan ekstrak kasar enzim bromelin : etanol adalah 1:4 dan didiamkan semalam pada temperatur \pm 6°C. Campuran disentrifuge selama 10 menit dengan kecepatan 13.000 rpm pada temperatur 4°C. Pelet (endapan) kemudian dilarutkan buffer fosfat pH 7 [6]. Kemudian enzim bromelin ekstrak buah nanas (*Ananas comosus*) yang sudah dilakukan pemurnian diencerkan menjadi 3 konsentrasi (8%, 10% dan 12%) menggunakan rumus[10] :

$$M1.V1 = M2.V2$$

Keterangan :

M1 = Konsentrasi awal
V1 = Volume awal
M2 = konsentrasi akhir
V2 = Volume akhir

Ekstrak yang sudah diencerkan sesuai konsentrasi selanjutnya dibentuk dalam sediaan gel dengan bahan basis gel HPMC. 7 gram HPMC didispersikan ke dalam 30 ml akuades pada suhu 80°C hingga mengembang dan diaduk sampai terbentuk basis gel. Metil paraben 0,2 gram dilarutkan pada akuades dan dipanaskan hingga larut, kemudian ditambahkan pada basis gel HPMC. Ekstrak enzim bromelin sebesar 10 ml dibasakan terlebih dahulu dengan NaOH 2 ml kemudian ditambahkan ke dalam gliserin sebesar 15 gram. Campuran ekstrak dan gliserin kemudian ditambahkan ke dalam basis gel dan diaduk hingga homogen. Sisa akuades ditambahkan sampai berat gel menjadi 100 gram. Sediaan gel yang didapat disimpan pada wadah yang tertutup rapat [11].

Tahap berikutnya yaitu perlakuan sampel. Sampel yang telah diberi kavitas dan dipotong secara longitudinal, diaplikasikan gel ekstrak enzim bromelin 8%, 10% dan 12% pada kavitasnya selama 2 menit dengan menggunakan syringe sebanyak 0,2 ml. Setelah 2 menit, kavitas diekskavasi manual dengan

ekskavator kecil tanpa tekanan. Gel ekstrak enzim bromelin pada kavitas dibersihkan dengan cotton pellet dan diirigasi dengan aquades. Kelompok kontrol hanya dilakukan irigasi pada kavitas [9].

Sampel yang telah diberi perlakuan didekalsifikasi dalam 10% asam nitrat selama 5 hari pada suhu kamar hingga jaringan berubah menjadi lunak. Setelah proses dekalsifikasi selesai, maka dilakukan proses dehidrasi dengan menggunakan alkohol berkonsentrasi rendah ke tinggi (bertingkat). Selanjutnya Clearing dengan menggunakan xylol karena dapat bercampur dengan alkohol dan media pemendam. Setelah clearing dilanjutkan dengan impregnasi, yaitu proses infiltrasi bahan embedding dalam parafin pada suhu 56°-60° C. Kemudian dilakukan penyayatan blok parafin dengan menggunakan mikrotom setebal 7 μ m dengan arah potong secara sagital. Tahap terakhir adalah pewarnaan preparat dengan menggunakan mallory trichrome . Preparat tersebut selanjutnya dilakukan pengamatan dengan menggunakan mikroskop binokuler perbesaran 1000 kali [12]. Pengukuran perubahan kolagen pada struktur dentin dilakukan oleh 3 pengamat secara bersamaan dalam 1 lapang pandang dengan menggunakan penggaris μ m pada perangkat lunak OptilabR ImageRaster 3.0 sebanyak 10 lapang pandang setiap sampel. Setiap lapang pandang diambil 3 ukuran terlebar dan hasil pengukuran tiap lapang pandang tersebut dijumlahkan dan dirata-rata besar pelebaran tiap sampel. Data pelebaran intertubulus dentin diuji dengan menggunakan analisis data *one way anova* dan uji lanjutan analisis LSD.

Hasil

Hasil penelitian menunjukkan adanya perubahan variasilebar intertubulus dentin. Lebar intertubulus dentin pada kelompok perlakuan menunjukkan adanya pelebaran dibandingkan dengan kelompok kontrol. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, berikut data perubahan lebar intertubulus dentin pada masing-masing kelompok.

Tabel 1. Data perubahan lebar intertubulus dentin pada masing-masing kelompok.

Kelompok	Jumlah Lebar intertubulus dentin (µm)	Rata-Rata Lebar intertubulus dentin (µm)
Kontrol	5,168	1,292
Perlakuan Enzim Bromelin 8%	8,840	2,210
Perlakuan Enzim Bromelin 10%	10,860	2,715
Perlakuan Enzim Bromelin 12%	8,982	2,245

Data perubahan lebar intertubulus dentin menunjukkan bahwa kelompok kontrol mempunyai rata-rata lebar intertubulus dentin yang lebih rendah dibandingkan kelompok perlakuan yaitu sebesar 1,292 µm sesuai batas normal lebar intertubulus dentin. Sedangkan pada kelompok perlakuan rata-rata lebar intertubulus dentin terbesar yaitu kelompok perlakuan enzim bromelin 10% yakni sebesar 2,715 µm.

Hasil pengamatan lebar intertubulus dentin diuji dengan menggunakan one way anova dan didapatkan hasil signifikansi sebesar 0,000.

Tabel 2. Hasil uji statistik One Way Anova pelebaran intertubulus dentin pada masing-masing kelompok.

	Jumlah	df	Rata-rata	Sig.
Antar Kelompok	4,254	3	1,418	0,000
Dalam Kelompok	0,538	12	0,045	
Total	4,791	15		

Kemudian analisis data dilanjutkan menggunakan uji LSD dan didapatkan hasil signifikansi < 0,05 kecuali pada kelompok perlakuan enzim bromelin 8% dibandingkan dengan konsentrasi 12% tidak terdapat perbedaan bermakna.

Tabel 3. Hasil uji statistik LSD pelebaran intertubulus dentin pada masing-masing kelompok.

	Kontrol	8%	10%	12%
Kontrol		0,00*	0,00*	0,000*
Perlakuan 8%	0,000*		0,006*	0,817
Perlakuan 10%	0,000*	0,006*		0,009*
Perlakuan 12%	0,000*	0,817	0,009*	

Pembahasan

Buah nanas (*Ananas comosus*) mengandung enzim proteolitik yang disebut dengan enzim bromelin. Enzim bromelin ini sebagian besar tersusun atas protease sistein sehingga enzim bromelin mampu memecah ikatan peptida pada protein dan mengubah protein tersebut menjadi lebih sederhana [3]. Enzim protease berperan dalam mengkatalis pemutusan ikatan peptida pada bahan yang mengandung protein dengan cara hidrolisis. Enzim proteolitik hanya bertindak atas kerusakan jaringan karena tidak adanya protease anti-plasmatik, alpha-1-antitrypsin, yang menghambat aksi proteolitik dalam jaringan [13]. Tidak adanya alpha-1-antitrypsin di jaringan yang telah mengalami kerusakan, memungkinkan enzim proteolitik untuk mendegradasi molekul dalam jaringan tersebut. Berdasarkan data penelitian didapatkan bahwa antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan terdapat perbedaan bermakna terhadap lebar intertubulus dentin. Hal ini disebabkan karena pada kelompok perlakuan yang diaplikasikan enzim bromelin ini dapat menghidrolisis kolagen pada intertubulus dentin karena tidak adanya alpha-1-antitrypsin [13].

Kelebihan enzim sebagai katalis dalam proses hidrolisis dibandingkan dengan bahan kimia lain adalah enzim memiliki spesifisitas yang tinggi, enzim hanya mengkatalis substrat tertentu, tidak terbentuk produk sampingan yang tidak diinginkan, produktivitas yang tinggi sehingga mengurangi biaya dan produk akhir pada umumnya tidak terkontaminasi [14]. Disamping itu, hidrolisis enzim dapat menghasilkan produk hidrolisat yang terhindar dari perubahan dan kerusakan produk yang bersifat non hidrolitik [15]. Berdasarkan prinsip kerja dari hidrolisis enzim yang memecah ikatan antara dua atom, hidrolisis pada kolagen dapat menyebabkan degradasi molekul kolagen karena pelepasan molekul air dari ikatannya [6].

Pemutusan ikatan hidrogen pada tropokolagen dentin secara histologi digambarkan dengan adanya pelebaran jarak intertubulus dentin karena polipeptida yang semula berbentuk triple helix berubah menjadi untai rantai polipeptida [15]. Berdasarkan

penelitian ini, nampak pada gambaran histologi jaringan intertubulus dentin gigi yang telah diaplikasikan enzim bromelin dengan konsentrasi 8%, 10% dan 12% mengalami perubahan lebar yang signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol. Lebar intertubulus

dentin ini secara normal adalah $\leq 2\mu\text{m}$ sedangkan pada kelompok perlakuan rata-rata lebar intertubulus dentin diatas $2\mu\text{m}$. Dalam reaksi hidrolisis ini protease bertindak sebagai nukleofilik yang bereaksi dengan membentuk satu molekul air [12]. Artinya, satu gugus amina dilepaskan dan dikeluarkan dari sisi aktif kemudian digantikan secara bersamaan dengan satu molekul air [17].

Kecepatan hidrolisis enzim meningkat pada konsentrasi enzim yang lebih besar tetapi jika konsentrasi enzim berlebihan maka proses hidrolisis tidak akan efisien [15]. Enzim bromelin dengan konsentrasi 8% dan 12% tidak efektif dalam mempengaruhi lebar intertubulus dentin karena sudah dalam batas kecepatan maksimum enzim sehingga enzim menjadi jenuh oleh substratnya yaitu kolagen sehingga tidak dapat berfungsi lebih cepat dalam proses hidrolisisnya [3]. Reaksi hidrolisis enzimatis dapat menyebabkan pemecahan ikatan hidrogen pada struktur asam amino hingga akhirnya terjadi proses konversi tropokolagen menjadi fibril kolagen tidak hanya dipengaruhi oleh konsentrasi enzim, namun waktu dan jenis enzim yang digunakan sangat berpengaruh [18]. Selain itu, enzim bromelin dengan konsentrasi 8% dan 12% kurang efektif juga dapat disebabkan karena beberapa faktor lain, yaitu besar kadar kolagen pada dentin tidak diperhitungkan (mg/ml) dan tidak dilakukan perhitungan unit aktivitas enzim bromelin [5].

Kemurnian enzim bromelin sangat berpengaruh pada proses hidrolisis substratnya [19]. Kemurnian enzim bromelin ini dapat diukur melalui perhitungan aktivitas spesifik enzim (U/mg) yang didapatkan dari unit aktivitas enzim dibagi dengan kadar proteinnya. Fraksi enzim bromelin terjadi saat aktivitas spesifik enzim maksimal [5]. Aktivitas spesifik enzim ini berbeda pada setiap kenaikan konsentrasi enzim. Hal inilah yang menyebabkan pada kelompok perlakuan enzim bromelin 8% dan 12% tidak terdapat pelebaran intertubulus dentin yang signifikan dibandingkan enzim bromelin konsentrasi 10%. Enzim bromelin dalam waktu 2 menit yang optimal dalam proses hidrolisis kolagen adalah konsentrasi enzim bromelin 10% karena semakin lebar intertubulus dentin maka hidrolisis kolagen yang rusak akan semakin besar sehingga kadar jaringan dentin yang sehat semakin besar. Hal ini didukung oleh pernyataan Miller yakni saat besar konsentrasi enzim sama dengan konsentrasi substrat (jumlah kolagen pada intertubulus dentin), proses kecepatan reaksi hidrolisis enzimatis

berlangsung seimbang [3].

Simpulan dan Saran

Pengaplikasian enzim bromelin tanaman nanas (*Ananas comosus(L.) Merr*) berbasis sediaan gel dengan konsentrasi 8%, 10% dan 12% selama 2 menit berpengaruh terhadap lebar intertubulus dentin dengan konsentrasi paling efektif adalah enzim bromelin tanaman nanas (*Ananas comosus(L.) Merr*) dengan konsentrasi 10%.

Saran yang dapat diberikan oleh peneliti antara lain, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh enzim bromelin pada bagian tanaman nanas yang lainnya selain pada bagian daging dan bonggol nanas, perlu dilakukan penelitian dengan menggunakan sampel gigi karies, perlu dilakukan penelitian terhadap konsentrasi dan durasi aplikasi enzim bromelin yang lebih bervariasi, perlu dilakukan uji aktivitas enzim bromelin, uji sitotoksitas serta uji klinis gel enzim bromelin pada gigi karies.

Daftar Pustaka

- [1] Depkes RI. Laporan Hasil Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) Nasional 2018. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI. 2018.
- [2] Dorland WA. Dorland's Pocket Medical Dictionary, 28th Ed. Singapore: Elsevier Pte Ltd. Terjemahan A. Agung Mahode. Kamus Saku Kedokteran Dorland, edisi 28. Jakarta: EGC. 2011.
- [3] Miller JC. Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry. England: Pearson Education Harlow. 2005.
- [4] Supartono. Karakterisasi Enzim Protease Netral dari Buah Nenas Segar. Jurnal MIPA Universitas Negeri Semarang. 2004: 27 (2): 134-142.
- [5] Herdyastuti N. Isolasi dan Karakterisasi Ekstrak Kasar Enzim Bromelin dari Batang Nanas (*Ananas comosus (L.) Merr*). Berk Penel Hayati. 2006: 12: 75-77.
- [6] Sebayang F. Pengujian Stabilitas Enzim Bromelin yang Diisolasi dari Bonggol Nanas Serta Imobilisasi Menggunakan Kappa Karagenan. Jurnal Sains Kimia. 2006: 10 (1): 20-26.
- [7] Fawzy IG, Fikri A, Hermawan N. Aktivitas Antiproliferasi Ekstrak Etanolik Herba Ciplukan (*Physalis angulata L.*) Terhadap Sel Hepar Tikus Betina Galur Sprague

- Dawley Terinduksi 7, 12-Dimetiparabenz (α) antrasen. Artikel Penelitian. 2012: 3 (1).
- [8] Gadi DS, Trilaksani W, Nurhayati T. Histologi, Esktraksi dan Karakterisasi Kolagen Gelembung Renang Ikan Cunang Muarenesox Talabon. Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis. 2017: 9 (2).
- [9] Jawa D, Singh S, Somani R, Jaidka S, Sirkar K, Jaidka R. Comparative Evaluation of the Efficacy of Chemomechanical Caries Removal Agent (Papacarie) and Conventional Method of Caries Removal: an in vitro study. J Indian Soc Pedod Prev Dent. 2010: 28 : 73-77.
- [10] Purba M. Kimia. Surabaya: Erlangga. 2007.
- [11] Yasid E, Nursanti L. Penuntun Praktikum Biokimia untuk cahasiswa Analis. Yogyakarta: Penerbit Andi. 2005.
- [12] Shoulders MD, Raines RT. Collagen Stucture and Stability. Jurnal Vbiochem. 2009: 78: 929-958.
- [13] Ganesh M, Parikh D. Chemomechanical Caries Removal (CMCR) Agents: Review and Clinical Application in Primary Teeth. Journal of Dentistry and Oral Hygiene. 2011: 3 (3): 34-45.
- [14] Ward OP. Protease Production. Appli Microbial Industrial. 2009. Hal. 495-511.
- [15] Jonsson A, Vidarsson JR. By Products from Whitefish Processing. USA: Skyrsla Matis. 2016.
- [16] Alhana PS, Tarman K. Ekstraksi dan Karakterisasi kolagen dari daging teripang gamma (*Sti-chopus variegatus*). J. Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia. 2015: 18 (2): 150-161.
- [17] Kolodziejska I. Effect of Extracting time and Temperature on Yield of Gelatin from Different Fish Offal. The Journal of Food Chemistry. 2007: 107: 700-706.
- [18] Lehninger A. Dasar-dasar Biokimia. Jakarta: Erlangga. 2008.
- [19] Halkerston IDK. Sinopsis Biokimia Jilid Satu. Tangerang Selatan: Binarupa Aksara Publisher. 2012.