

Hidrolisis Protein Isolat Biji Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) menggunakan Alkalase Terimobilisasi dan Aktivitasnya sebagai Antihipertensi (*Hydrolysis of Melinjo Seed (Gnetum gnemon* L.) *Isolated-Protein* *using Immobilized Alcalase and Its Activity as Antihypertensive*)

Nur Fauziah Matra¹, Endah Puspitasari¹, Tri Agus Siswoyo²

¹Fakultas Farmasi, Universitas Jember

²Center for Development of Advanced Sciences and Technology (CDAST), Universitas Jember, Fakultas
Pertanian, Universitas Jember

Jalan Kalimantan 37, Jember 68121

email korespondensi: triagus.faperta@unej.ac.id

Abstract

*Hypertension is ranked third on the cause of death in Indonesia for all ages (6.8 %). Protein isolate of melinjo seeds (*Gnetum gnemon* L.) hydrolyzed with free alcalase has been known to have antihypertensive activity. However, the use of free alcalase is uneconomical since it can only be used once, thus we studied the immobilized alcalase effectivity to hydrolyse the melinjo seeds protein isolate to be used as angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor. The immobilization method used entrapment method with DDMOS/TMOS as matrix. Characterization of the immobilized enzyme was observed by FTIR and effectiveness of repeated hydrolysis was observed by the value of the degree of hydrolysis. The success of the hydrolysis process was determined by SDS-PAGE electrophoresis. Antihypertensive activity test was determined by the ability to inhibit ACE. The results showed that the alcalase has been immobilized in the matrix of silane and SDS-PAGE protein profile showed melinjo seed proteins had been successfully hydrolyzed. Hydrolysis process repeatedly demonstrated that immobilized alcalase was effective to hydrolyze protein isolates of melinjo seeds twice. Based on ACE inhibitory test, there were no significant differences between the protein isolate hydrolyzed by immobilized alcalase (Gg-PH), protein isolates hydrolyzed with free alcalase (Gg-PHB), and captopril. These findings suggest that the antihypertensive activity in Gg-PH is the same with that of captopril.*

Keywords: hypertension, antihypertensive, melinjo, enzymes immobilization, ACE inhibitor

Abstrak

Hipertensi menduduki peringkat ketiga dari penyebab kematian utama di Indonesia untuk semua umur (6,8 %). Protein isolat biji melinjo yang dihidrolisis dengan alkalase bebas telah diketahui memiliki aktivitas sebagai antihipertensi. Namun penggunaan alkalase bebas tidak ekonomis dan hanya dapat digunakan sekali saja, sehingga kami melakukan penelitian tentang efektivitas alkalase terimobilisasi untuk menghidrolisis protein isolat biji melinjo sebagai antihipertensi. Metode imobilisasi enzim yang digunakan adalah metode penjerapan dengan DDMOS/TMOS sebagai matriks. Karakterisasi enzim terimobilisasi diamati dengan FTIR dan efektivitas hidrolisis berulang diamati berdasarkan nilai derajat hidrolisis. Keberhasilan proses hidrolisis ditentukan dengan elektroforesis SDS-PAGE. Uji aktivitas antihipertensi ditentukan dengan melihat kemampuan dalam menghambat *angiotensin converting enzyme* (ACE). Hasil menunjukkan bahwa enzim alkalase telah terimobilisasi di dalam matriks silan dan profil protein SDS-PAGE menunjukkan protein biji melinjo telah berhasil dihidrolisis. Hidrolisis berulang menunjukkan enzim alkalase terimobilisasi efektif menghidrolisis protein isolat biji melinjo hingga dua kali. Berdasarkan uji aktivitas ACE *inhibitor*, tidak ada perbedaan yang signifikan antara protein isolat yang dihidrolisis dengan alkalase terimobilisasi (Gg-PH), protein isolat yang dihidrolisis dengan alkalase bebas (Gg-PHB), dan kaptopril. Hal ini menunjukkan bahwa aktivitas antihipertensi pada Gg-PH sama dengan aktivitas antihipertensi pada kaptopril.

Kata kunci: hipertensi, antihipertensi, melinjo, imobilisasi enzim, ACE inhibitor

Pendahuluan

Hipertensi menduduki peringkat ketiga dari penyebab kematian utama di Indonesia untuk semua umur (6,8%), setelah stroke (15,4%) dan tuberkulosis (7,8%). Hipertensi ditandai dengan peningkatan tekanan darah sistolik lebih dari 140 mmHg dan tekanan darah diastolik lebih dari 90 mmHg [1]. Sistem angiotensin mempunyai peranan penting dalam pengaturan tekanan darah [2]. Renin yang disekresi oleh ginjal berfungsi mengubah angiotensinogen menjadi angiotensin I. Selanjutnya oleh ACE, angiotensin I diubah menjadi angiotensin II yang dapat menyebabkan penyempitan pembuluh darah (vasokonstriksi), sehingga terjadi peningkatan tekanan darah.

Siswoyo dan Sugiharto [3] menyebutkan bahwa protein isolat biji melinjo yang dihidrolisis menggunakan alkalase bebas memiliki aktivitas sebagai antihipertensi. Namun penggunaan enzim bebas tidak ekonomis dan hanya dapat digunakan sekali saja. Hal tersebut dapat diatasi dengan teknik imobilisasi enzim. Imobilisasi enzim didefinisikan sebagai enzim yang secara fisik ditempatkan dalam suatu matriks padat (*support*) dengan tetap memiliki aktivitas katalitiknya [4]. Salah satu metode imobilisasi enzim, yakni metode penjerapan (*entrapment*) merupakan metode yang paling mudah dan efektif untuk teknik imobilisasi enzim [5]. Melalui teknik modifikasi ini diharapkan dapat meminimalisir penggunaan enzim yang tidak ekonomis, sehingga produksi protein hidrolisat yang memiliki aktivitas sebagai antihipertensi dapat terpenuhi secara cepat. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui efektivitas enzim alkalase terimobilisasi dalam menghidrolisis protein secara berulang dan mengetahui aktivitas antihipertensi protein biji melinjo.

Metode Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah *true experimental laboratories*. Pemilihan sampel dilakukan secara acak. Sampel yang digunakan adalah biji melinjo yang telah masak secara fisiologis, ditandai dengan kulit luar berwarna merah. Biji melinjo diperoleh dari petani di daerah Kalibaru, Kabupaten Banyuwangi, yang dipanen pada bulan Juli 2015 pada pagi hari. Terdapat 4 kelompok perlakuan, yaitu kelompok kontrol positif (kaptopril), kelompok protein isolat (Gg-PI), kelompok protein yang dihidrolisis dengan alkalase terimobilisasi (Gg-PH), dan kelompok protein

yang dihidrolisis dengan alkalase bebas (Gg-PHB). Masing-masing kelompok diuji aktivitas antihipertensi-nya pada berbagai konsentrasi (0,0002; 0,002; 0,02; 0,2; dan 2 µg/µl). Penelitian ini dilakukan di laboratorium CDAST Universitas Jember pada bulan September 2015–selesai.

Alat dan bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah *shaker incubator* (Stuart S1600), oven (Carbolite), sentrifuse (Tomy MRX-150 dan Hitachi CR21GIII), spektrofotometer (Hitachi tipe U-2900 UV-Vis), elektroforesis SDS-PAGE (Bio-Rad), *dry block heater* (Techne), FTIR (Bruker Alfa), stirer, vortex, timbangan analitik, blender, mikropipet, dan *syringe* Hamilton.

Bahan yang digunakan adalah biji melinjo; akuades; 0,2 M buffer fosfat pH 8; 1 M HCl; 1 M NaOH; 0,1 M Na₂SO₃; enzim alkalase 24 L FG (2,4 AU/g dan densitasnya 1,18 g/mL); 0,1% reagen asam trinitro benzen sulfonat (TNBS); reagen Bradford; PEG 20000; 1 M NaF (Wako); isopropil alkohol; *bovine serum albumin* (BSA) (Sigma); dimetil dimetoksi silan (DMDMOS) (Ald rich); tetrametil ortosilikat (TMOS) (Shin etsu); standar L-leusin (Wako), dan seperangkat bahan SDS-PAGE.

Imobilisasi enzim alkalase

Dalam gelas vial 10 ml, larutan alkalase 3,12 mL, PEG 2000 0,8 mL, NaF 0,4 mL, dan isopropil alkohol 0,8 mL dicampur dan dihomogenkan menggunakan stirer magnetik pada kecepatan 600 rpm. Kemudian ditambahkan 24 mmol DMDMOS/TMOS (1:1). Larutan diaduk pada suhu ruang hingga terbentuk gel. Gel yang diperoleh dikeringkan dalam ruang dingin (4°C). Karakterisasi enzim terimobilisasi diamati menggunakan FTIR.

Ekstraksi dan isolasi protein biji melinjo

Sampel (25 gram) dihaluskan dengan menambahkan 75 mL akuades (1:3). Kemudian disaring dan suspensi yang diperoleh disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 15°C. Selanjutnya supernatan (Gg-PK) diatur pH-nya menjadi 4 dengan menggunakan 1 M HCl untuk dapat mempresipitasi protein. Kemudian suspensi dibiarkan selama 30 menit untuk memungkinkan protein dapat terendapkan secara sempurna. Setelah itu larutan disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu 15°C. Endapan protein (Gg-PI) yang diperoleh diresuspensi

dengan akuades dan diatur pH-nya menjadi 8 menggunakan NaOH 1 N.

Hidrolisis protein isolat biji melinjo

Optimasi kondisi dilakukan terlebih dahulu sebelum melaksanakan hidrolisis protein. Optimasi yang dilakukan adalah optimasi suhu inkubasi (30, 40, 50, dan 60°C), waktu inkubasi (0,5, 1, 2, 4, 6, 12, 18, dan 24 jam), jumlah enzim (1, 5, 10, dan 20 mg), dan konsentrasi substrat (2, 4, 5, 6, dan 8 mg/mL). Proses hidrolisis didasarkan pada metode yang telah dilakukan oleh Siswoyo dan Sugiharto [6]. Protein isolat 200 µl ditambahkan dengan enzim terimobilisasi dan buffer fosfat (pH 8) 300 µl. Campuran kemudian diinkubasi dan hasilnya disentrifus dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu 25°C. Bagian supernatan diambil sebagai protein hidrolisat biji melinjo (Gg-PH) yang selanjutnya ditentukan derajat hidrolisisnya. Semua pengujian dilakukan tiga kali replikasi. Derajat hidrolisis ditentukan menggunakan metode TNBS [7]. Sampel 5 µl dicampur dengan 400 µl 0,2 M buffer fosfat (pH 8) dan 200 µl 0,1 % TNBS, kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu 50°C. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 400 µl 0,1 N Na₂SO₃ lalu didinginkan pada suhu ruang, kemudian dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 420 nm. Kurva standart *L-leucine* digunakan untuk mengetahui konsentrasi asam amino. Persentasi derajat hidrolisis (DH) ditentukan dengan persamaan sebagai berikut:

$$DH = \frac{h}{h_{tot}} \times 100$$

h adalah jumlah ikatan peptida yang dihidrolisis dan h_{tot} adalah jumlah total ikatan peptida per ekuivalen protein.

Penentuan total protein terlarut

Kandungan protein diukur dengan metode Bradford [8]. Sampel sebanyak 5 µl ditambahkan dengan 45 µl akuades dan ditambah dengan 950 µl reagen Bradford, kemudian absorbansi diukur pada panjang gelombang λ 595 nm. Hasil yang diperoleh dibandingkan dengan standar BSA (konsentrasi 1, 5, 10, 15, dan 20 µg/µl) untuk mengetahui kandungan protein terlarut. Protein kemudian ditentukan berat molekulnya menggunakan SDS-PAGE sesuai dengan metode Laemmli [9].

Uji aktivitas antihipertensi protein biji melinjo

Aktivitas antihipertensi ditentukan dengan menggunakan ACE kit-WST-1 [10]. Larutan sampel dipreparasi dengan proses pengenceran (konsentrasi sampel 2 µl). Pengujian dilakukan dengan menambahkan 20 µl larutan sampel, 20 µl buffer substrat, dan 20 µl larutan kerja enzim ke dalam *microplate*. Blanko 1 dibuat dengan menambahkan 20 µl akuades, 20 µl buffer substrat, dan 20 µl larutan kerja enzim ke dalam *microplate*. Sedangkan, blanko 2 dibuat dengan menambahkan 40 µl akuades dan 20 µl buffer substrat ke dalam *microplate*. Kemudian diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C. Selanjutnya, dimasukkan 200 µl larutan indikator dan diinkubasi kembali selama 10 menit pada suhu ruang. Ukur absorbansi pada panjang gelombang 450 nm. Kemudian ditentukan aktivitas ACE *inhibitor* dan analisis IC₅₀. Aktivitas ACE *inhibitor* dapat dihitung dengan persamaan sebagai berikut::

$$ACE\ inhibitor = \frac{(A_{blanko1} - A_{sampel})}{A_{blanko1} - A_{blanko2}} \times 100$$

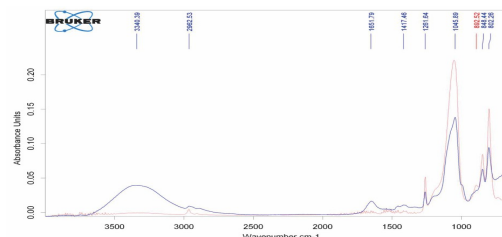
A adalah absorbansi

Analisis data

Data dianalisis menggunakan analisis statistik one way ANOVA.

Hasil Penelitian

Karakterisasi enzim alkalase terimobilisasi dengan FTIR ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Spektra FTIR matriks dan enzim alkalase terimobilisasi. Garis merah menunjukkan spektra enzim matriks, garis biru menunjukkan spektra enzim alkalase terimobilisasi

Gambar 1 menunjukkan adanya perbedaan antara spektra matriks (garis merah) dengan spektra enzim alkalase terimobilisasi (garis biru). Spektra dominan muncul pada

pada daerah serapan antara 3.000-3.500 cm⁻¹ dan 1000-1500 cm⁻¹.

Hasil ekstraksi dan isolasi protein biji melinjo menunjukkan bahwa Gg-PI memiliki konsentrasi protein tertinggi (Tabel 1).

Tabel 1. Hasil produksi bertahap protein biji melinjo

Sampel uji	Volume (mL)	Konsentrasi (µg/µl)	Total protein (mg)
Gg-PK	42	6,401	268,842
Gg-PI	19	7,225	137,275
Gg-PH	11	2,710	29,81

Berdasarkan hasil optimasi, diperoleh kondisi optimal untuk hidrolisis protein yaitu pada suhu inkubasi 50°C dengan derajat hidrolisis sebesar 44,11 ± 3,36 %, waktu hidrolisis selama 4 jam dengan derajat hidrolisis sebesar 30,72 ± 0,14 %, jumlah enzim 5 mg dengan derajat hidrolisis sebesar 57,12 ± 0,68 %, dan konsentrasi substrat 5 mg/mL dengan derajat hidrolisis sebesar 38,01 ± 0,64 % (Gambar 2)

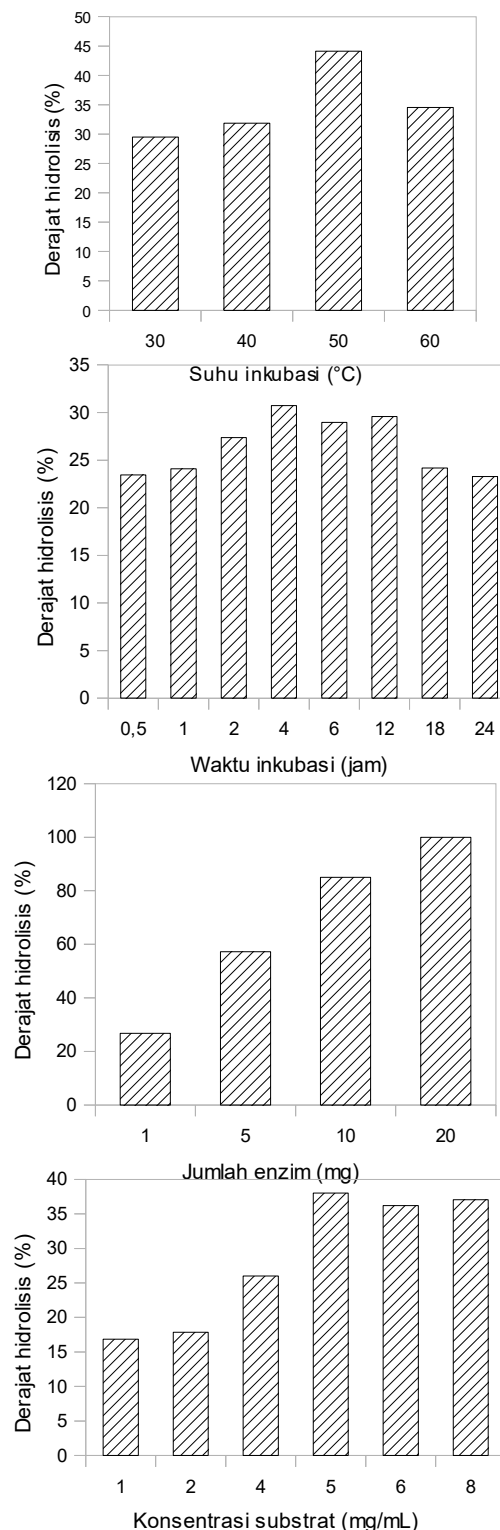
Selanjutnya hasil hidrolisis berulang ditunjukkan pada Gambar 3. Hasil menunjukkan bahwa enzim alkalase terimobilisasi efektif menghidrolisis protein hingga penggunaan yang kedua. Hasil elektroforesis SDS-PAGE menunjukkan terdapat empat pita protein dengan berat molekul yang berbeda yakni ± 76, ± 63, ± 26, dan ± 14 Kda. Hasil SDS-PAGE ditunjukkan pada Gambar 4.

Aktivitas ACE inhibitor meningkat seiring dengan bertambahnya konsentrasi uji (Gambar 5). Gambar 5, menunjukkan bahwa Gg-PI memiliki aktivitas ACE inhibitor paling rendah. Nilai IC₅₀ dari Gg-PH, Gg-PHB, dan kaptopril dapat dilihat pada Tabel 2. Analisis statistik menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan yang signifikan di antara ketiganya (LSD, p>0,05).

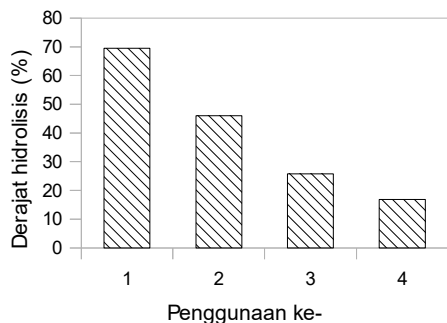
Tabel 2. Nilai IC₅₀ Gg-PH, Gg-PHB, dan kaptopril.

Sampel	Nilai IC ₅₀ (µg/µl)
Gg-PH	2,457 ± 0,213 ^a
Gg-PHB	2,214 ± 0,195 ^a
Kaptopril	2,085 ± 0,202 ^a

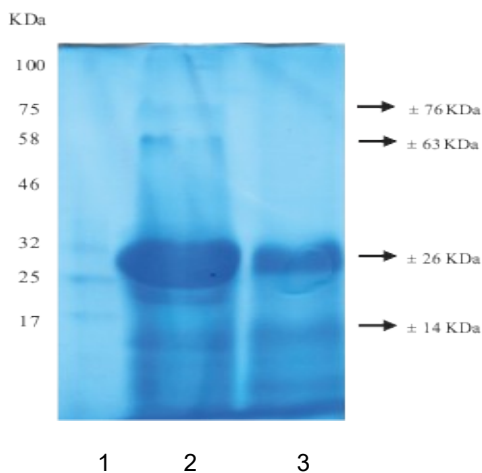
Keterangan: Notasi huruf sama yang menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan (LSD, p > 0,05)



Gambar 2. Persentasi derajat hidrolisis (DH) protein biji melinjo hasil optimasi.



Gambar 3. Persentasi derajat hidrolisis (DH) pada beberapa kali penggunaan



Gambar 4. Hasil SDS-PAGE protein biji melinjo. (1) marker protein; (2) Gg-PK; (3) Gg-PH

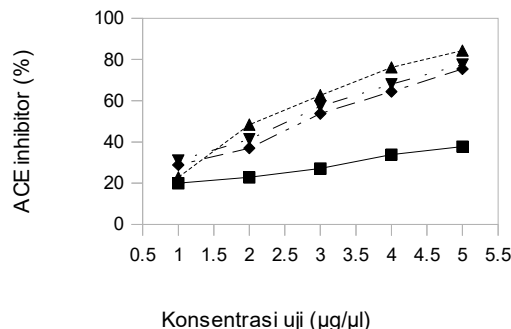
Pembahasan

Karakterisasi imobilisasi enzim

Gambar 1 menunjukkan pada daerah serapan antara 3.000-3.500 cm^{-1} , spektra matriks (garis merah) memiliki intensitas yang rendah, ditandai dengan nilai absorbansi yang mendekati nol. Sedangkan pada daerah serapan yang sama, spektra enzim alkalase terimobilisasi (garis biru) memiliki intensitas yang tinggi (nilai absorbansi 0,05). Hal ini menunjukkan bahwa telah terjadi interaksi antara enzim dengan matriks yang menghasilkan gugus OH. Menurut Gokgoz dan Yigitoglu [11] daerah di antara 3.000 dan 3.700 cm^{-1} merupakan daerah serapan gugus OH paling kuat.

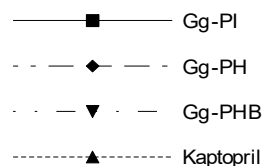
Spektra matriks di daerah serapan 1.045 cm^{-1} memiliki intensitas yang tinggi. Sedangkan spektra enzim alkalase terimobilisasi memiliki intensitas yang rendah pada daerah serapan yang sama. Hal ini menunjukkan bahwa adanya interaksi antara matriks dengan enzim alkalase

menyebabkan menurunnya gugus fungsi eter yang merupakan gugus utama dari matriks silan. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa enzim alkalase telah terimobilisasi.



Gambar 5. Aktivitas ACE inhibitor protein isolat biji melinjo (Gg-PI), protein biji melinjo yang dihidrolisis dengan alkalase terimobilisasi (Gg-PH), protein biji melinjo yang dihidrolisis dengan alkalase bebas (Gg-PHB), dan kontrol positif (kaptopril)

Keterangan:



Ekstraksi dan isolasi protein biji melinjo

Hasil produksi bertahap Gg-PK, Gg-PI, dan Gg-PH (Tabel 1) memiliki perbedaan dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Sembodo pada perbandingan yang sama (1:3) [12]. Jumlah protein yang diperoleh adalah lebih besar. Perbedaan jumlah protein tersebut dapat disebabkan oleh perbedaan tempat tumbuh dari pohon melinjo. Pada penelitian sebelumnya, biji melinjo diperoleh dari petani daerah Jember yang merupakan daerah dataran sedang. Tanaman melinjo yang tumbuh di daerah dataran sedang memiliki kandungan protein yang lebih tinggi [13]. Hal tersebut menunjukkan bahwa ketinggian lokasi tumbuh mempengaruhi kandungan protein.

Optimasi kondisi hidrolisis dan profil pita protein biji melinjo

Hidrolisis dikatakan baik jika nilai derajat hidrolisis (DH) lebih dari 30 % [14]. Enzim alkalase terimobilisasi yang efektif

menghidrolisis hingga dua kali diharapkan dapat meminimalisir penggunaan enzim bebas yang kurang ekonomis. Pada Gambar 4, terlihat pita protein Gg-PK dengan berat molekul ± 76 , ± 63 , ± 26 , dan ± 14 KDa terlihat jelas. Namun, pada protein Gg-PH dengan berat molekul yang sama memperlihatkan pita protein yang mengalami pemudaran. Hal ini menunjukkan bahwa telah terjadi proses hidrolisis protein pada Gg-PH.

Aktivitas antihipertensi protein biji melinjo

Aktivitas antihipertensi terendah terdapat pada Gg-PI. Hal tersebut dapat disebabkan karena Gg-PI masih berada dalam bentuk makromolekul. Bentuk ini menyebabkan hanya sebagian saja Gg-PI yang dapat menempel pada *catalytic site* yang umumnya berbentuk celah. Seperti yang diketahui, *catalytic site* merupakan tempat pengikatan substrat atau proses katalis berlangsung. Semakin banyak protein yang menempel pada *catalytic site*, maka perubahan angiotensin I menjadi angiotensin II mampu dihambat [15]. Hal inilah yang menyebabkan Gg-PH (bentuk mikromolekul) memiliki aktivitas antihipertensi yang lebih tinggi dibandingkan dengan Gg-PI.

Nilai IC_{50} menunjukkan kemampuan protein menghambat ACE sebanyak 50 %. Semakin kecil nilai IC_{50} maka semakin besar tingkat efisiensi penghambatannya terhadap ACE [16]. Gg-PI tidak ditentukan nilai IC_{50} -nya dikarenakan aktivitas antihipertensi Gg-PI tidak mencapai 50%. Hasil analisis statistik menunjukkan antara Gg-PH, Gg-PHB, dan kaptopril tidak ada perbedaan yang signifikan (LSD, $p>0,05$), sehingga dapat dikatakan bahwa protein biji melinjo baik yang dihidrolisis dengan alkalase bebas dan terimobilisasi memiliki aktivitas yang sama seperti kaptopril.

Simpulan dan Saran

Kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian yang telah dilakukan adalah enzim alkalase terimobilisasi efektif dalam menghidrolisis protein biji melinjo, ditandai dengan DH lebih dari 30 % pada dua kali penggunaan dan protein hidrolisat biji melinjo (Gg-PH) memiliki aktivitas sebagai antihipertensi yang lebih tinggi dibandingkan protein isolat biji melinjo (Gg-PI), dengan nilai IC_{50} $2,457 \pm 0,213$ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Untuk pemanfaatan protein hidrolisat biji melinjo sebagai antihipertensi secara maksimal perlu dilakukan uji lanjutan seperti uji in vivo, uji toksisitas, dan uji klinis.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kepada Divisi Nutrasetikal dan Farmasetikal CDAST Universitas Jember yang telah mendanai penelitian ini.

Daftar Pustaka

- [1] Depkes RI. Profil kesehatan Indonesia. Jakarta: Depkes RI; 2014.
- [2] Dipiro JT, Talbert RL, Yee GC, Matzke GC, Wells BG, Posey LM. Pharmacotherapy seventh edition. New York: McGraw Hill; 2007.
- [3,6] Siswoyo TA, Sugiharto B. Produksi pengembangan protein antihipertensi generasi baru dari protein *Gnetum gnemon* sebagai bahan nutrasetikal komersial. Prosiding InSINas. 2012: 217-222.
- [4] Katchalski-Katzir E. Immobilized enzyme: learning from past successes and failures. Dept. Membr. Res. Biophys. 1993: 11: 471-478.
- [5] Reetz MT, Tielmann P, Wiesenhofer W, Konen W, Zonta A. Second generation sol-gel encapsulated lipases: robust heterogeneous biocatalysts. Adv. Synth. Catal. 2003: 345: 717-728.
- [7] Adler-Nissen J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by titrobenzene sulfonic acid. Agric. Food Chem. 1979: 27 (6): 1256-1262.
- [8] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 1976: 72: 248-254.
- [9] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970: 227: 680-685.
- [10] Lam LH, Shimamura T, Manabe S, Ishiyama M, Ukeda H. Assay of angiotensin i-converting enzyme-inhibiting activity based on the detection of 3-hydroxybutyrate with water soluble tetrazolium salt. Anal. Sci. 2008: 24: 1057-1060.
- [11] Gokgoz M, Yigitoglu M. Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* on to modified carboxymethylcellulose for production of ethanol. Springer. 2011: 34: 849-857.
- [12] Sembodo TAP. Uji aktivitas secara in vitro dan kemampuan proteksi terhadap

- kerusakan DNA dari protein biji melinjo (*Gnetum gnemon*). Skripsi. 2015: Fakultas Kedokteran Universitas Jember.
- [13] Wulaningrum N. Potensi protein antioksidan dari biji dan daun tanaman melinjo (*Gnetum gnemon*) pada ketinggian lokasi yang berbeda. Skripsi. 2013: Fakultas Pertanian Universitas Jember.
- [14] Himonides AT, Taylor AKD, Morris AJ. A study of the enzymatic hydrolysis of fish frames using model systems. *Food Nutr. Sci.* 2011; 2: 575-585.
- [15] Azhar KT, Siwoyo TA, Santosa A. Uji aktivitas protein isolat biji melinjo (*Gnetum gnemon*) sebagai antihipertensi secara in vivo. *E-Jurnal Pustaka Kesehatan.* 2014; 2(3): 382- 386.
- [16] Febrisiantosa A, Purwanto BP, Arief IS, Widyastuti Y. Karakteristik fisik, kimia, mikrobiologi whey kefir dan aktivitasnya terhadap penghambatan angiotensin converting enzyme (ACE). *J. Teknol dan Industri Pangan.* 2013; 24(2): 147-153.