

AKTIVITAS PENGHAMBATAN ALFA AMILASE (α -AMYLASE INHIBITOR) HIDROLISAT GELATIN TULANG ITIK

M. Habbib Khirzin¹⁾, M. Hilmi²⁾, A.U. Prastujati³⁾, N. Mawardi⁴⁾, R. Rahayu⁵⁾

^{1,2,3,4,5}Teknologi Pengolahan Hasil Ternak, Politeknik Negeri Banyuwangi, Jl. Raya
Jember Km 13 Labanasem, Kabat, Banyuwangi, 68461
E-mail: habbibkhirzin@poliwangi.ac.id

Abstract

Diabetes mellitus (DM) is a metabolic disease indicated by the decreasing of insulin production. Drug therapy to cure DM had negative effects, so it was necessary to find alternatives. Several studies reported that the peptides produced from protein hydrolysis had alpha amylase and alpha glucosidase inhibitor activity. The purpose of this study were to determine the hydrolysis of gelatin using cysteine protease enzyme and the inhibitory activity of alpha amylase. This study was divided into 2 phases; (1) gelatin extraction, and (2) gelatin hydrolysis and alpha amylase inhibition test. This study used a completely randomized design with a unidirectional pattern with 3 times repetition. Research parameters included total dissolved protein, degree of hydrolysis, and alpha amylase inhibitory activity. The results showed that the differences in hydrolysis time treatment had a significant effect ($P < 0.05$) on all parameters. The highest total protein was found in hydrolysis time of 180 minutes, which was 463.27 mg /ml. While the highest degree of hydrolysis was found at the time of hydrolysis of 240 minutes, which was 20.49%. The IC_{50} value for alpha amylase from the 240 minutes hydrolysis time treatment was 5.92 mg/ ml. Further research is necessary to re-optimize the hydrolysis process.

Keywords: Duck bone, gelatine hydrolysate, alpha amylase inhibitor

Abstrak

Diabetes mellitus (DM) merupakan penyakit metabolik yang ditandai dengan menurunnya produksi insulin. DM ada 2 tipe dan yang sering diderita oleh masyarakat adalah tipe II yaitu kadar gula darah melebihi batas normal yaitu 70-130 mg/dL. Terapi obat untuk penyembuhan DM memiliki efek negatif sehingga perlu dicari alternatif secara non farmakologi. Beberapa penelitian melaporkan bahwa peptida yang dihasilkan dari hidrolisis protein memiliki aktivitas inhibitor enzim alfa amilase dan alfa glukosidase. Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengetahui proses hidrolisis gelatin menggunakan enzim sistein protease serta aktivitas penghambatan alfa amilase. Penelitian ini dibagi menjadi 2 tahap yaitu pertama ekstraksi gelatin kedua hidrolisis gelatin serta uji penghambatan alfa amilase. Penelitian menggunakan rancangan acak lengkap pola searah dengan 3 kali ulangan. Parameter penelitian meliputi total protein terlarut, derajat hidrolisis, serta aktivitas penghambatan alfa amilase. Hasil penelitian menunjukkan perbedaan perlakuan waktu hidrolisis berpengaruh nyata ($P < 0.05$) terhadap seluruh parameter. Total protein tertinggi terdapat pada waktu hidrolisis 180 menit yaitu sebesar 463,27 mg/ml, sedangkan derajat hidrolisis tertinggi terdapat pada waktu hidrolisis 240 menit yaitu sebesar 20,49%. Nilai IC_{50} terhadap alfa amilase dari perlakuan waktu hidrolisis 240 menit sebesar 5,92 mg/ml. Penelitian selanjutnya perlu dilakukan optimasi kembali proses hidrolisis.

Kata Kunci: Tulang itik, hidrolisat gelatin, penghambatan alfa amilase

PENDAHULUAN

Diabetes mellitus merupakan penyakit metabolik yang ditandai dengan menurunnya produksi insulin di dalam pankreas atau tubuh tidak mampu menggunakan secara penuh insulin yang telah diproduksi. Diabetes mellitus menjadi salah satu penyebab utama kematian di dunia dan diperkirakan akan meningkat sebanyak 50% selama 10 tahun kedepan (WHO, 2014). Penyakit diabetes militus ada dua tipe yaitu tipe I dan tipe II. Tipe I disebabkan karena kerusakan autoimun sel beta pancreas sedangkan diabetes tipe II yaitu kondisi ketika kadar gula darah melebihi batas normal yaitu 70-130 mg/dL (Ndisang *et al*, 2017).

Tipe II merupakan diabetes yang paling banyak diderita oleh masyarakat. Beberapa terapi yang dilakukan untuk mengobati diabetes yaitu menurunkan hiperglikemia pada postprandial (Chakrabharti dan Rajagopalan, 2002). Hal ini bisa dilakukan dengan menghambat aktivitas enzim yang memecah karbohidrat seperti alfa amylase dan alfa glukosidase. Alfa amilase memecah ikatan kompleks polisakarida pati menjadi amilosa rantai pendek sedangkan alfa glukosidase memecah disakarida menjadi gula sederhana (glukosa). Penghambat mekanisme alfa amilase dan alfa glukosidase merupakan target yang potensial untuk dikembangkan sebagai terapi penderita diabetes (Subramanian *et al*, 2008)

Beberapa terapi yang selama ini dilakukan untuk mengobati diabetes mellitus yaitu terapi secara obat. Obat antidiabetik oral yang sering digunakan yaitu akarbose yang berfungsi menghambat enzim alfa amilase di dalam usus halus. Obat sintetik memiliki beberapa efek samping diantaranya diare, perut kembung, dan kram di saluran pencernaan. Beberapa penelitian melaporkan bahwa peptida yang dihasilkan dari hidrolisis protein memiliki aktivitas penghambatan enzim alfa amilase dan alfa glukosidase seperti yang dilaporkan Roskar *et al*. (2015) dan Ramadhan *et al*. (2017). Peptida protein memiliki karakteristik yang berbeda-beda dalam menghambat enzim. Beberapa peptida bahkan menunjukkan penghambatan yang lebih baik dibandingkan obat komersial. Eksplorasi sumber bahan alami untuk terapi diabetes terus dikembangkan. Oleh karena itu, tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengetahui proses hidrolisis gelatin menggunakan enzim sistein protease serta aktivitas penghambatan alfa amilase.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu pisau, timbangan, oven, vortex, hotplate, gelas beaker, labu erlenmeyer, sentrifuge, tabung reaksi, mikropipet, spektrofotometer UV-Vis, inkubator, waterbath shaker, dan booth sensor. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu tulang unggas, aquades, NaOH, HCl, enzim bromelin, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, Na₂CO₃, CuSO₄, NaKTartrat, Folin-ciocalteau, BSA (*Bovine Serum Albumine*), TCA (*Trichloric acetic acid*), pati (*starch*), asam dinitro salisilat (DNS), akarbose, dan alfa amilase.

Prosedur Penelitian

Penelitian ini dibagi menjadi 2 tahapan yaitu pertama ekstraksi gelatin, dan kedua yaitu hidrolisis dan uji aktivitas penghambatan alfa amilase. Ekstraksi gelatin dilakukan berdasarkan metode Jannah *et al.* (2013). Tulang direndam dalam aquades dan direbus 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 suhu 80°C selama 2 jam dan dikeringkan. Hidrolisis gelatin dilakukan berdasarkan metode Zhang *et al.* (2013). Satu gram sampel dilarutkan ke dalam 100 ml buffer-fosfat pH 7.0. Selanjutnya enzim papain (1:10) (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.

Parameter Penelitian

Total Protein Terlarut (Lowry *et al.*, 1951)

Sampel diambil sebanyak 1 ml dan ditambah 3 ml aquades. Sampel selanjutnya ditambahkan dengan 5,5 ml reagen lowry, divortex, lalu diinkubasi selama 15 menit pada suhu 25°C. Sampel ditambahkan reagen folin-ciocalteau 0,5 ml, divortex, dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu 25°C. Sampel diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 750 nm lalu hasil absorbansi diplotkan ke dalam kurva regresi linier. Larutan BSA dengan seri konsentrasi (0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 mg/ml) digunakan sebagai standar.

Derajat Hidrolisis (Modifikasi Silvestree *et al*, 2013)

Sampel hidrolisat gelatin sebanyak 0,5 ml ditambahkan dengan 0,5 ml TCA 20% untuk menghasilkan 10% fraksi terlarut dan 10% fraksi tidak terlarut TCA. Campuran divortex lalu diinkubasi selama 30 menit pada suhu 4⁰C. Selanjutnya sampel disentrifugasi dengan kecepatan 6.000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang dihasilkan dianalisis kadar nitrogennya dengan metode Kjeldahl. Derajat hidrolisis dihitung menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{Derajat Hidrolisis (\%)} = \frac{\text{Nitrogen terlarut dalam TCA 20\%}}{\text{Nitrogen total sampel}} \times 100\%$$

Uji Aktivitas Penghambatan Alfa Amilase (Sancheti *et al.*, 2007)

Tahap pertama yaitu menyiapkan buffer fosfat 0,1 M pH 6,9 sebanyak 100 ml. Pati (substrat) dilarutkan ke dalam buffer fosfat sebanyak 25 µL lalu dihomogenkan dan diinkubasi pada suhu 37⁰C. Sampel dilarutkan ke dalam buffer lalu dibuat seri konsentrasi 500; 1000; 2000; 4000 ppm, dimasukkan ke dalam substrat dan diinkubasi. Enzim alfa amilase 0,04 v/ml dilarutkan ke dalam buffer fosfat lalu seluruh sampel, substrat, dan enzim dicampurkan dan diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 100 µl DNS dan 100 µl NaOH lalu dipanaskan selama 3 menit. Sampel selanjutnya diukur absorbansinya pada panjang gelombang 410 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Pengujian diulangi sebanyak 3 kali. Aktivitas penghambatan alfa amilase dinyatakan sebagai persen inhibisi (%) dan diplotkan ke dalam kurva regresi linier untuk mendapatkan nilai *inhibition concentration* 50 (IC₅₀). Rumus persen penghambatan:

$$\text{Persen penghambatan (\%)} = \frac{(\text{Absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel})}{\text{Absorbansi kontrol}} \times 100\%$$

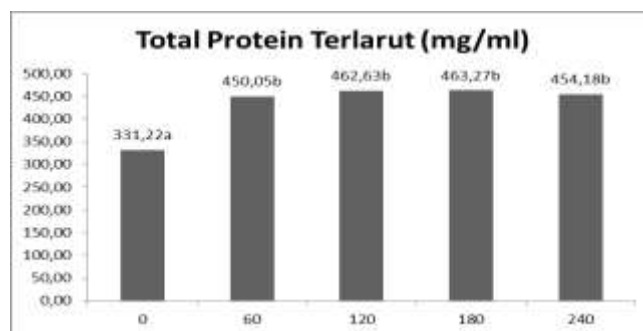
Rancangan Penelitian dan Teknik Analisa Data

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 kali ulangan atau 15 unit percobaan. Hasil terbaik dari uji protein total dan derajat hidrolisis akan dilanjutkan dengan uji penghambatan alpha amilase. Data hasil penelitian akan dianalisa menggunakan ANOVA dan apabila terdapat perbedaan yang nyata (P < 0,05) maka akan dilanjutkan dengan uji DMRT dan polinomial ortogonal.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Total Protein Terlarut

Konsentrasi protein yang ada di dalam sampel merupakan hasil dari nilai absorbansi yang dimasukkan ke dalam plot kurva regresi linier standar BSA. Konsentrasi protein hidrolisat gelatin tulang itik menggunakan enzim papain dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Konsentrasi protein hidrolisat gelatin tulang itik. Huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$)

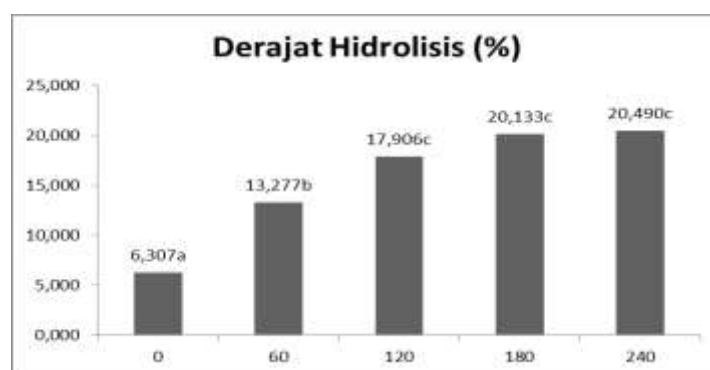
Konsentrasi protein terendah terdapat pada perlakuan hidrolisis 0 menit yaitu 331,22 mg/ml sedangkan konsentrasi protein tertinggi terdapat pada perlakuan hidrolisis 180 menit yaitu 463,27 mg/ml. Perbedaan waktu hidrolisis memberikan pengaruh yang beda nyata terhadap konsentrasi protein sampel. Protein meningkat secara signifikan dari perlakuan 0 menit menuju 60 menit. Selanjutnya protein konstan dan tidak ada perbedaan yang signifikan hingga 240 menit. Menurut Nielsen (1997), proses hidrolisis menyebabkan kandungan protein yang semula tidak larut secara perlahan menjadi terlarut dan menjadi senyawa yang lebih sederhana. Perubahan ini menyebabkan serapan absorbansi mengalami peningkatan sehingga konsentrasi protein juga semakin tinggi.

Derajat Hidrolisis (DH)

Persen derajat hidrolisis menunjukkan efektivitas enzim dalam memecah substrat. Derajat hidrolisis hidrolisat gelatin tulang itik menggunakan enzim papain dapat dilihat pada Gambar 2. Perbedaan waktu hidrolisis berpengaruh nyata terhadap persen derajat hidrolisis. Nilai DH semakin meningkat seiring dengan bertambahnya waktu hidrolisis akan tetapi ketika sudah mencapai 120 menit, 180 menit dan 240 menit nilai menjadi stabil dan tidak ada perbedaan yang signifikan. Derajat hidrolisis terendah terdapat pada waktu hidrolisis 0 menit yaitu sebesar 6,31% sedangkan yang tinggi terdapat pada

waktu hidrolisis 120;180; dan 240 menit yaitu masing-masing sebesar 17,906%; 20,133%; dan 20,49%.

Beberapa riset melaporkan Nilai DH suatu produk hidrolisat sangat bervariasi. Kerang yang dihidrolisis dengan bromelin memiliki DH 58% (Haslaniza *et al*, 2010). Hidrolisis siput tanah dengan papain menghasilkan DH 24,83% (Ulagesan *et al*, 2018). Ketika proses hidrolisis, maka papain akan memecah substrat menjadi produk oleh gugus histidin (His-159) dan sistein (Cys-25) pada sisi katalitik enzim. Papain bekerja pada asam amino lisin, alanin, glisin, tirosin (Amri dan Mamboya, 2012).



Gambar 2. Persen derajat hidrolisis gelatin tulang itik. huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$)

Aktivitas Penghambatan Alfa Amilase

Aktivitas penghambat menunjukkan seberapa kuat sampel menghambat/menghentikan kinerja enzim alfa amilase dalam memecah substrat pati. Semakin tinggi aktivitasnya maka semakin berpotensi untuk dikembangkan sebagai terapi hipoglikemik. Aktivitas penghambatan dan IC_{50} disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1

Aktivitas Penghambatan dan IC_{50} Hidrolisat Gelatin Tulang Itik			
No	Konsentrasi sampel (ppm)	Aktivitas Penghambatan (%)	IC_{50} (ppm)
1	500	17,31%	5926
2	1000	27,91%	
3	2000	34,17%	
4	4000	37,92%	

Sampel yang diuji aktivitas penghambatan alfa amilase merupakan sampel terbaik dari hasil uji total protein dan DH yaitu sampel yang dihidrolisis selama 240 menit. Data penelitian menunjukkan bahwa gelatin tulang itik yang dihidrolisis dengan enzim papain menunjukkan aktivitas penghambatan alfa amilase. Persen penghambatan berkisar antara 17,31% hingga 37,92% dari konsentrasi 500 hingga 4000 ppm. Nilai IC_{50} yang didapatkan yaitu 5926 ppm atau 5,93 mg/mL. Nilai ini masih tergolong

sangat lemah. Akarbose yang digunakan sebagai kontrol positif memiliki IC_{50} sebesar 44 ppm atau 0,044 mg/mL. Aktivitas penghambatan alfa amilase dari berbagai sumber memiliki nilai yang bervariasi. Admassu *et al.* (2018) menyatakan protein rumput laut yang dihidrolisis menggunakan pepsin memiliki nilai IC_{50} sebesar 1,86 mg/mL. Laoufi *et al.* (2017) dalam penelitiannya melaporkan tanaman herbal *Ononis angustissima* yang diekstrak menggunakan air memiliki aktivitas penghambatan alfa amilase dengan IC_{50} sebesar 2,52 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 yaitu dari golongan kacang-kacangan seperti *Pigeonpea cajanus* (Giri *et al.*, 1998), *Phaseolus vulgaris* (Grossi *et al.*, 1997), dan kacang kedelai *Glycine max* (Wahyuntari dan Tekol, 2012). Sumber nonprotein yang telah diteliti memiliki aktivitas penghambatan alfa amilase adalah tanaman herbal seperti *Salix matsudara* (Han *et al.*, 2003), *Linun usitatisunum* (Sudha *et al.*, 2001), dan ginseng *Panax ginseng* (Hui *et al.*, 2009).

SIMPULAN DAN SARAN

Gelatin tulang itik yang dihidrolisis menggunakan enzim papain selama 240 menit memiliki nilai total protein terlarut sebesar 454,18 mg/ml, nilai derajat hidrolisis sebesar 20,49% dan IC_{50} sebesar 5,93 mg/ml. Saran untuk penelitian selanjutnya yaitu dilakukan reoptimasi proses hidrolisis serta pemurnian hidrolisat agar aktivitas yang didapatkan semakin meningkat.

DAFTAR PUSTAKA

- [WHO] World Health Organization. 2014. *Commission on ending childhood obesity*. Geneva, World Health Organization. Departement of Noncommunicable Disease Surveillance.
- Admassu, H., Abdalbasit, M., Gasmala, Yang, R., & Zhao, W. (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.
- Amri, E. & Mamboya, F. (2012). Papain, a Plant Enzyme of Biological Importance: A Review. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*. Vol 8(2):99-104.
- Chakrabarti, R., & Rajagopalan R. (2002). Diabetes and insulin resistance associated disorders: Disease and the therapy. *Current science*. 83(12) 1533-1538

- Giri, A.P., & Kachole, M.V. (1998). Amylase inhibitors of pigeonpea (*Cajanus cajan*) seeds. *Phytochemistry* 47: 197-202.
- Grossi, S.M.F., Mirkov, T.E., Ishimoto, M., Colucci, G., Bateman, K.S., & Chrispeels M.J. (1997). Molecular characterization of a bean α -amylase inhibitor that inhibits the α amylase of the Mexican bean weevil *Zabrotes subfasciatus*. *Planta* 203: 295-303.
- Han, L.K., Sumiyoshi, M., Zhang, J., Liu, M.X., Zhang XF, Zheng, Y.N., Kimura, Y. (2003). Anti-obesity Action of *Salix matsudana* Leaves (Part 1). Anti-obesity Action by Polyphenols of *Salix matsudana* in High Fat-diet Treated Rodent Animals, *Phytother. Res* 17: 1188–1194.
- Haslaniza, H., Maskat, M.Y., Wan, W.M., & Mamot, S. (2010). The Effect of enzyme concentration, temperature, and incubation time of nitrogen content and degree of hydrolysis of protein precipitate from cockle (*Anadara granosa*) meat wash water. *International Food Research Journal*. 17:147-152.
- Hui, H., Tang, G., Go, V.L.W. (2009). Hypoglycemic herbs and their action mechanisms. *Chinese Med* 4:11.
- Jannah, A., (2013). Isolasi dan karakterisasi gelatin dari tulang ayam dengan metode asam. *Alchemy*. 2013.
- Laoufi, H., Benariba, N., Adjdir, S., & Djaziri, R. (2017). In vitro α -amylase and α -glucosidase inhibitory activity of *Ononis angustissima* extract. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 7 (02): 191-198.
- Lowry, O.H., Roseburgh, N.J., Farr, A.L., Randal, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal Biology and Chemistry*. 193:265-275.
- Ndisang, JF., Alfredo V., & Sharad, R. (2017). Insulin resistance, type 1 and type II diabetes, and related complication 2017. *Journal of Diabetics Research*. 2017:1-3.
- Nielsen, P. M. (1997). *Functionality of protein hydrolysates*. New York (USA): Marcel Decker.
- Ramadhan AH., Tazbidul N., Xiaowei Z., Warda MP., Wenshui X., & Yanshun, X. (2018). Purification and identification of a novel antidiabetic peptide from Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*) protein hydrolysate against alpha amylase and alpha glucosidase. *International Journal of Food Properties*. 20(53): 53300-53372.
- Roskar, I., Peter M., Miha V., Mateja S., Borut S., & Mojna L. (2015). Peptides modulator of alpha-glucosidase. *Journal of Diabetes Investigation*. 6: 625-631
- Sancheti, S., Seo, S.Y. (2007). *Chaenomeles sinensis*: A potent alpha and betha glucosidase inhibitor. *American Journal of Pharmacy and Toxicology*. 4:8-11.
- Silvestre, M.P.C., (2013). Degree of hydrolysis and peptide profile of whey proteins using pancreatin. *Nutrire Rev. Soc. Bras. Aliment. Nutr*, 38(3): p. 278-290.
- Subramanian, R., Asmawi A.Z., Sadikun, A. (2008). In Vitro Alpha-glucosidase and alpha-amylase enzyme inhibitory effects of *Andrographis paniculata* extract and andrographolide. *Journal of Acta Biochim Pol*. 55(2): 391-399.
- Ulagesan, S., Kuppasamy, A., & Kim, H.J. (2018). Antimicrobial and antioxidant activities of protein hydrolysate from terrestrial snail *Cryptozona bistrialis*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. Vol 8(12):012-019.

- Wahyuntari, B., M.N. Tekol. 2012. Isolation of alpha amylase inhibitors from mungbean and soybean and inhibitory effect oh human salivary and porcine pancreatic amylase. *Jurnal sains dan teknologi Indonesia*. Vol 14 (1): 12-16.
- Zhang, Y. (2013). Effect of pretreatment on enzymatic hydrolysis of bovine collagen and formation of ACE-inhibitory peptides. *Food Chemistry*. 141(3): p. 2343-2354.