

## BROMELIN UNTUK PRODUKSI GELATIN TULANG KAMBING KACANG

Dellen N. Matulesy<sup>1\*)</sup>, Yuny Erwanto<sup>2)</sup>, Philipus J. Kastanya<sup>1)</sup>, Marcus J.J. Latupapua<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Politeknik Perdamaian Halmahera

Jl. Raya Trans Galela-Tobelo, Wari Ino, Tobelo, Halmahera Utara 97762, Indonesia

<sup>2)</sup>Program studi Peternakan, Fakultas Peternakan, Universitas Gadjah Mada

Jl. Fauna No.03, Karang Gayam, Caturtunggal, Sleman, Yogyakarta 55281, Indonesia

\*Email: mdellen18@gmail.com

(Submitted: 09-10-2023; Revised: 14-10-2023; Accepted: 16-10-2023)

---

### ABSTRAK

Penelitian bertujuan untuk mengevaluasi sifat kimia, fisik dan fungsional gelatin tulang kambing Kacang yang diekstraksi menggunakan bromelin. Tulang yang telah melewati perlakuan awal, diinkubasi bromelin dengan konsentrasi yang berbeda pada pH 6 dengan suhu 50°C selama 48 jam, selanjutnya diekstraksi pada suhu 60°C selama 3 jam. Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan acak lengkap pola searah dengan 4 perlakuan konsentrasi bromelin yaitu GB-0 (gelatin dengan bromelin 0 %), GB-1 (Gelatin dengan bromelin 10 U), GB-2 (Gelatin dengan bromelin 15 U dan GB-3 (Gelatin dengan bromelin 20 U) dengan 5 ulangan. Variabel yang diamati adalah rendemen, analisis proksimat (kadar air, abu, lemak dan protein kasar), pH, distribusi berat molekul protein, profil gugus fungsional FTIR, morfologi, *foaming expansion* (FE) dan *stability* (FS) serta kapasitas dan stailitas emulsi gelatin. Hasil penelitian menunjukkan rendemen tertinggi pada gelatin tulang kambing Kacang dengan perlakuan bromelin 20 U (GB-3), adalah 8,31%. Kadar air, protein, sifat *foaming* dan emulsi tertinggi dengan perlakuan bromelin 15 U (GB-2), dengan pH, kadar abu terendah. Rantai  $\beta$  telah terdegradasi, rantai  $\alpha 1$  dengan berat molekul 31,00 - 91,12 kDa, menghilangnya tripel heliks ditunjukkan FTIR dan struktur gel yang lebih halus, kompak dengan rongga yang lebih kecil pada gelatin GB-1 dan GB-2. Kesimpulan dari penelitian ini adalah bromelin 15 U/g tulang dapat digunakan untuk ekstraksi tulang kambing Kacang dengan menghasilkan gelatin dengan sifat fisiokimia dan fungsional yang dapat digunakan untuk aplikasi pangan.

Kata kunci: Bromelin, gelatin tulang kambing Kacang, sifat fisiokimia dan fungsional

### BROMELIN FOR THE PRODUCTION OF KACANG GOAT BONE GELATIN

#### ABSTRACT

This study aims to evaluate the chemical, physical and functional properties of Peanut goat bone gelatin extracted using bromelain. Bones that have undergone initial treatment are incubated with different concentrations of bromelain at pH 6 with a temperature of 50°C for 48 hours, then extracted at a temperature of 60°C for 3 hours. The research design used was a completely randomized unidirectional design with 4 bromelain concentration treatments, namely GB-0 (gelatin with 0% bromelain), GB-1 (gelatin with 10 U of bromelain), GB-2 (gelatin with 15 U of bromelain and GB-3 (Gelatin with 20 U bromelain) with 5 replications. Variables observed were yield, proximate analysis (moisture, ash, fat and crude protein content), pH, protein molecular weight distribution, FTIR functional group profile, morphology, foaming expansion (FE) and stability (FS) as well as the capacity and stability of the gelatin emulsion. The results of the study showed that the highest yield in goat bone gelatin Peanuts treated with 20 U bromelain (GB-3), was 8.31%. The highest water, protein, foaming and emulsion properties with 15 U bromelain treatment (GB-2), with the lowest pH, ash content. The  $\beta$  chain has been degraded, the  $\alpha 1$  chain with a molecular weight of 31.00 - 91.12 kDa, the disappearance of the triple helix shown by FTIR and a smoother, more compact gel structure with smaller cavities in GB-1 and GB-2 gelatin. The conclusion of this research is that bromelain 15 U/g bone can be used for the extraction of goat bones. Peanuts produce gelatin with physiochemical and functional properties that can be used for food applications.

Key words: Bromelain, Kacang goat bone gelatin, physiochemical and functional properties

---

## PENDAHULUAN

Pemanfaatan gelatin sangat luas dalam berbagai aplikasi baik bidang farmasi, kosmetik, makanan maupun minuman karena sifat fisik, kimia dan fungsionalnya yang unik, memiliki struktur yang stabil dan bernutrisi dengan kandungan beberapa asam amino esensial (Ali *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2012). Berdasarkan kemanfaatannya itu, maka penelitian-penelitian tentang gelatin mengalami kemajuan, terkait keberagaman sumber bahan baku, metode ekstraksi sampai modifikasi untuk mendapatkan gelatin yang berkualitas, aman dan dapat diterima oleh semua lapisan dan golongan masyarakat.

Berbagai sumber bahan baku alternatif produksi gelatin telah dikembangkan dengan metode ekstraksi asam, alkali maupun enzimatis, dan telah mendapat perhatian lebih, seperti dari ikan (Mirzapour-Kouhdasht *et al.*, 2018), unggas (Samsudin *et al.*, 2018; Abedinia *et al.*, 2017), mamalia seperti unta dan domba (Al-Hassan, 2020; Zarei *et al.*, 2019), bahkan serangga serta amfibi (Tümerkan *et al.*, 2019; Mariod & Fadul, 2015), namun penelitian tentang produksi gelatin tulang kambing Kacang menggunakan enzim bromelin belum dilakukan bahkan dipublikasikan.

Tulang kambing Kacang mengandung protein kolagen dan dapat diekstraksi menghasilkan gelatin. Keterbatasan utama pemakaian tulang sebagai bahan baku gelatin, khususnya hewan mamalia antara lain karena struktur tulang padat dan keras dengan kadar abu yang tinggi, sehingga memerlukan waktu perlakuan awal yang panjang, yaitu sekitar 20 sampai 60 hari untuk pembengkakan dan penghilangan kandungan mineral tulang, dengan hasil ekstraksi yang sangat rendah (Ma *et al.*, 2019). Di samping tingginya kadar abu pada tulang, tentunya sangat mempengaruhi sebagian besar karakteristik fisik, kimia dan fungsional gelatin yang dihasilkan dan dapat melebihi batas yang ditetapkan untuk makanan, dengan demikian menarik untuk menggunakan metode ekstraksi yang tepat sesuai bahan baku tulang.

Gelatin dapat diekstraksi secara kimiawi dan enzimatis. Ekstraksi enzimatis biasanya menggunakan enzim protease. Enzim Bromelin adalah salah satu protease endopeptidase tiol dari sistein. Aktivitas enzim bromelin sangat tergantung dari kelompok tiol dari residu sistein dalam sisi aktifnya (Amid *et al.*, 2011). Bromelin ditemukan dalam jaringan batang dan buah nanas (*Ananas comosus*), dan telah banyak digunakan dalam berbagai aplikasi industri (Ramli *et al.*, 2018) karena dapat mengkatalisis hidrolisis ikatan peptida dalam protein dan dapat dieksploitasi. Beberapa penelitian yang memanfaatkan kemampuan bromelin dalam mengkatalisis protein antara lain dalam industri farmasi, makanan, hidrolisat protein, tekstil dan kosmetik (São Paulo Barretto Miranda *et al.*, 2017; Imelda *et al.*, 2017; Ninpetch *et al.*, 2015) serta produksi gelatin ikan (Norziah *et al.*, 2014). Berdasarkan penjelasan tersebut, maka dirasa perlu untuk mengkaji

lebih lanjut potensi bromelin untuk memproduksi gelatin dari tulang kambing Kacang, dengan mengidentifikasi sifat kimia, fisik dan fungsional gelatin yang dihasilkan terutama sebagai bahan pelapis, pengikat dan pembentuk gel untuk produk pangan.

## BAHAN DAN METODE

### Materi

Bahan baku yang digunakan adalah tulang kambing Kacang pada semua bagian tubuh yang telah dipisahkan dari daging. Kambing Kacang dipilih yang berumur antara 6–12 bulan (berdasarkan *recording*). Enzim bromelin sumber batang nanas dengan aktivitas  $\geq 3\text{U/mg}$ , diperoleh dari Sigma-Aldrich Chemical (St. Louis, MO, USA). Bahan kimia yang digunakan adalah NaOH, Butyl alkohol, EDTA 2-Na, HCl, 4-dimethylamino-benzaldehyde, Chloramine-T, minyak kedelai, Trichloroacetic acid (TCA), bromophenol blue, 2-mercaptoethanol, glyserin, gylisin, N,N,N'-tetramethylethylenediamine (TEMED), Ammonium Persulfate (APS), N,N'-methylenebisacrylamide (Bis), Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), Akrilamid, Tris-HCl pH 8,8 dan 6,8, Coomassie brilliant blue, asam asetat, methanol, ddH<sub>2</sub>O, marker berat molekul dan minyak kedelai.

### Prosedur Penelitian

Tulang kambing Kacang sebanyak yang bisa dikumpulkan, dibersihkan dan disimpan di *freezer* pada suhu -20°C. Saat digunakan, tulang dicairkan pada suhu 4°C selama 12 jam, dibersihkan dari kontaminan permukaan, lemak, daging dan kutikula yang masih menempel dengan merendam dalam air panas 40°C selama 30 menit. Tulang dipotong dan dikeluarkan sumsum, dikeringkan di oven pada suhu 40°C selama 24 jam dan dilakukan pengecilan ukuran (0,5 cm) menggunakan lumpang besi (Matulesy *et al.*, 2021).

Tulang yang telah dicecilkan ukurannya, direndam dalam 0,5 M NaOH dengan perbandingan tulang dan larutan 1 : 5 (g/v) selama 48 jam untuk menghilangkan protein non-kolagen. Larutan NaOH diganti setiap 12 jam, selanjutnya dibilas hingga pH menjadi netral, dilanjutkan dengan perendaman dalam butil alkohol 10% (v/v) volume 10 ml selama 72 jam untuk menghilangkan lemak. Larutan butil alkohol diganti setiap 12 jam, selanjutnya dibilas hingga pH menjadi netral. Demineralisasi dilakukan dengan merendam tulang dalam 0,5 M EDTA-2Na (pH = 7,5) volume 10 ml selama 5 hari. Larutan perendaman diganti setiap 12 jam, kemudian tulang dibilas sampai diperoleh pH netral (Ling ling *et al.*, 2018).

Ekstraksi diawali dengan inkubasi tulang menggunakan enzim bromelin pada konsentrasi 0, 10, 15 dan 20 U/g tulang dalam air suling dengan rasio tulang dan air 1 : 5 (g/v) pH 6, suhu inkubasi 50°C selama 48 jam (Ahmad *et al.*, 2018). Selanjutnya campuran diatur pada pH 7 dan aktivitas enzim dihentikan pada suhu 90°C selama 15 menit dan

dilanjutkan dengan ekstraksi pada suhu 60°C selama 3 jam. Larutan disaring menggunakan kertas saring whatman No. 4, kemudian dikeringkan di oven pada suhu 50°C selama 48 jam. Hasil pengeringan berupa gelatin dikumpulkan selanjutnya dihaluskan dan ditimbang.

Gelatin yang diekstraksi dari tulang kambing Kacang tanpa perlakuan enzim bromelin dinyatakan sebagai GB-0 dan yang diberi enzim dengan konsentrasi yang berbeda, dinyatakan masing-masing sebagai GB-1: gelatin dengan bromelin 10 U, GB-2: gelatin dengan bromelin 15 U dan GB-3: gelatin dengan bromelin 20 U.

Rendemen gelatin diperoleh menggunakan rumus mengikuti metode Ktari *et al.* (2014):

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{\text{Berat gelatin}}{\text{Berat kering tulang}} \times 100$$

### Identifikasi Sifat Kimia, Fisik, Fungsional Gelatin

**Analisis proksimat.** Analisis proksimat gelatin, meliputi kadar air (950,46), abu (920,153), lemak (960,39) dan protein (984,13) ditentukan berdasarkan kandungan nitrogen menggunakan metode Kjeldahl (AOAC, 2000). Faktor konversi nitrogen untuk tulang 6,25 dan gelatin 5,55.

**pH.** Gelatin kering sebanyak 0,667 g dilarutkan dalam 10 ml air suling pada suhu 60 °C selama 30 menit menggunakan magnetik stirer IKA C-MAG HS 7. Larutan gelatin didinginkan pada suhu kamar selama 30 menit, dan elektroda kaca yang terhubung ke pH meter HI 2210, distandarisasi dengan buffer standar pH 4, 7 dan 9, digunakan untuk menentukan pH pada 25°C (See *et al.*, 2011).

**Distribusi berat molekul.** Berat molekul gelatin ditentukan menggunakan elektroforesis gel natrium dodecyl sulfate polyacrylamide menurut metode Laemmli (1970). Gelatin (5 mg/ml) diinkubasi pada 95 °C selama 5 menit dan disentrifus pada 5000 × g selama 5 menit. Sampel gelatin (10 µl) dicampurkan dengan 0,5 buffer tris HCl (pH 6,8), 5% 2-mercaptoetanol, 20% glyserol, 0,1% bromophenol blue dan 10% SDS gradien 4-20%. Gel dijalankan pada 90 V, kemudian diwarnai dengan Coomassie blue brilliant dalam 10% asam asetat 40 % metanol dan ddH<sub>2</sub>O 40%.

**Analisis profil gugus fungsional.** Profil gugus fungsional dengan *Spektroskopi fourier transform infrared* (FTIR) menggunakan spektrometer Perkin Spectrum One (Shimadzu prestige 21), jarak bilangan 4000 hingga 650 cm<sup>-1</sup>, dengan metode teknik preparasi pelet KBr (Kalium Bromide). Cuplikan (0,1 - 2%) dan KBr dicampur pada rasio 1 : 100 ditumbuk, kemudian dipress pada tekanan 8 sampai 20 ton/satuan luas hingga bentuknya menjadi pellet. Cuplikan pellet dipakai untuk mengukur spektrum absorbansi dari 4000 hingga 650 cm<sup>-1</sup>. Sinyal spektrum dikumpulkan dalam 36 pemindaian dengan resolusi 16 cm<sup>-1</sup>. Analisis data spektral dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak (Renuka *et al.*, 2019).

**Morfologi gelatin.** Morfologi gelatin diamati dengan *Scanning Electron Microscope* (SEM) SU3500 dengan pembesaran 3000 kali pada tegangan 10kV. Gelatin kering (6,67%) dipasang pada potongan perunggu dan dilapisi sputter emas dengan menggunakan pemercik ion. Selanjutnya dilihat dan direkan dengan SEM (Jongjareonrak *et al.*, 2006).

**Uji sifat foaming.** Penentuan sifat *foaming* terdiri dari *foaming expansion* (FE) dan *foaming stability* (FS) mengikuti metode (Ktari *et al.*, 2014). Larutan gelatin disiapkan dalam konsentrasi 1% (w/v). Larutan gelatin 25 ml dihomogenisasi pada kecepatan 13.000 rpm pada suhu ruangan. Total volume diukur. *Foaming expansion* (FE) dihitung menggunakan rumus:

$$\text{FE (\%)} = \frac{V_r - V_0}{V_0} \times 100$$

Sampel yang dikocok disimpan diam pada suhu 20°C selama 30 menit, selanjutnya total volume dicatat dan *foaming stability* (FS) dihitung dengan rumus:

$$\text{FS (\%)} = \frac{V_t - V_0}{V_0} \times 100$$

Dimana:

V<sub>r</sub> = volume setelah dikocok (ml)

V<sub>0</sub> = Volume sebelum dikocok (ml)

V<sub>t</sub> = Volume setelah 30 menit (ml).

**Uji sifat emulsi.** Sifat emulsi gelatin terdiri dari kapasitas dan stabilitas emulsi (Bichukale *et al.*, 2018). Gelatin sebanyak 1 g dilarutkan dengan 50 ml air suling dingin (4°C) dan 50 ml minyak kedelai. Campuran dihomogenkan, selanjutnya 50 ml dipindahkan ke tabung sentrifus dan langsung disentrifus pada kecepatan 3500 rpm selama 10 menit dan 50 ml lainnya disentrifus pada kondisi yang sama setelah dipanaskan dalam *waterbath* pada suhu 80°C selama 30 menit dan didinginkan pada suhu kamar. Ketinggian lapisan emulsi merupakan persentase dari total tinggi bahan dalam tabung yang tidak dipanaskan dan dipanaskan, digunakan untuk menghitung kapasitas dan stabilitas emulsi, dengan rumus:

$$\text{Kapasitas emulsi (\%)} = \frac{\text{Tinggi lapisan emulsi}}{\text{Tinggi seluruh lapisan}} \times 100$$

$$\text{Stabilitas emulsi (\%)} = \frac{\text{Tinggi lapisan emulsi setelah dipanaskan}}{\text{Tinggi seluruh lapisan}} \times 100$$

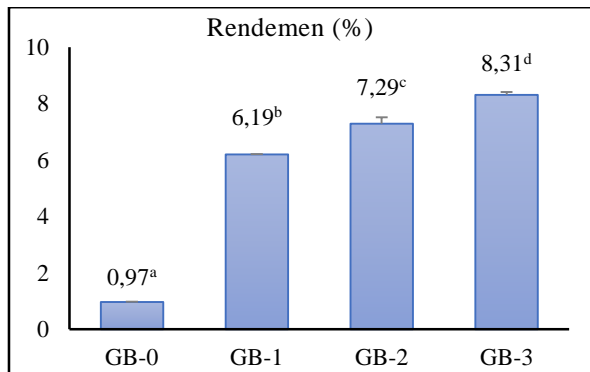
### Analisis Statistik

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola searah, yang dianalisis menggunakan ANOVA dan dilanjutkan dengan uji lanjut Duncan pada tingkat kepercayaan 95% dengan SPSS versi 26.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Rendemen Gelatin

Rendemen gelatin yang diperoleh dari ekstraksi tulang kambing Kacang dengan perlakuan enzim bromelin ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Rendemen Gelatin Tulang Kambing Kacang Perlakuan Bromelin  
<sup>a,b,c,d</sup> Superskrip yang berbeda menunjukkan berbeda nyata ( $P < 0,05$ )

Ekstraksi dengan menggunakan bromelin menunjukkan bahwa rendemen gelatin semakin

Tabel 1. Sifat Kimia Gelatin Tulang Kambing Kacang

Variabel	Jenis gelatin			
	GB-0	GB-1	GB-2	GB-3
Abu	12,08 ± 0,31 <sup>a</sup>	2,13 ± 0,11 <sup>p</sup>	2,51 ± 0,16 <sup>p</sup>	2,54 ± 0,28 <sup>p</sup>
Air	9,15 ± 0,18 <sup>a</sup>	9,50 ± 0,06 <sup>b</sup>	9,90 ± 0,03 <sup>c</sup>	9,20 ± 0,37 <sup>a</sup>
Lemak	2,43 ± 0,09 <sup>b</sup>	1,34 ± 0,02 <sup>a</sup>	1,45 ± 0,06 <sup>a</sup>	1,59 ± 0,45 <sup>a</sup>
Protein	39,03 ± 0,57 <sup>p</sup>	69,88 ± 0,42 <sup>q</sup>	71,92 ± 0,22 <sup>r</sup>	69,70 ± 0,19 <sup>q</sup>
pH	7,29 ± 0,09 <sup>b</sup>	6,17 ± 0,06 <sup>a</sup>	6,15 ± 0,19 <sup>a</sup>	6,15 ± 0,25 <sup>a</sup>

<sup>a,b,c</sup> Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata ( $P < 0,05$ )

<sup>p,q,r</sup> Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda sangat nyata ( $P < 0,01$ )

**Kadar abu.** Kadar abu tertinggi pada gelatin tanpa penambahan bromelin (GB-0) 12,08% dan menurun pada gelatin yang mendapat perlakuan bromelin ( $P < 0,05$ ). Tingginya kadar abu gelatin GB-0, diduga karena tingginya kadar abu tulang kambing Kacang sebagai bahan baku gelatin (49,43%) yang sulit dihilangkan saat proses demineralisasi (Matulessy, *et al.*, 20021). Hasil ini mirip dengan penelitian Chuaychan *et al.* (2016) yang melakukan demineralisasi pada sisik ikan dengan larutan asam klorida dan menemukan sebagian besar mineral masih tertahan dalam matriks sisik ikan. Rendahnya kadar abu semua gelatin dengan penambahan bromelin, karena kemampuan bromelin menguraikan struktur tulang, memisahkan protein non kolagen dan menghilangkan senyawa anorganik sebelum diekstraksi.

meningkat dengan bertambahnya konsentrasi bromelin ( $P < 0,05$ ). Rendemen gelatin tertinggi dengan perlakuan bromelin GB-3 adalah 8,31%, diikuti GB-2 7,29% dan GB-1 6,19% dan rendemen terendah 0,97% pada GB-0.

Peningkatan rendemen disebabkan masih tersedia protein substrat pada konsentrasi bromelin tertinggi, sehingga akan semakin banyak peptida yang terhidrolisis. Pada penelitian ini konsentrasi enzim meningkat sedangkan konsentrasi substrat tetap, dengan demikian jumlah molekul enzim lebih tinggi dari jumlah molekul substrat yang akan dikatalisis, sehingga gelatin yang dihasilkan juga meningkat. Bromelin mengandung hampir 90% dari bahan proteolitik aktif (Rowan *et al.*, 1990). Ketika jumlah enzim bertambah, maka semakin besar kecepatan hidrolisis sehingga pemecahan tripel heliks menjadi rantai polipeptida juga semakin tinggi yang menyebabkan konversi kolagen menjadi gelatin bertambah (Kolodziejaska *et al.*, 2008).

Penggunaan enzim bromelin dengan rendemen gelatin yang berbeda dilaporkan Ahmad *et al.* (2020) pada gelatin kulit sapi 19,11 – 23,49% dan gelatin tulang sapi dengan hidrolisis asam 4,39% (Jelita *et al.*, 2018).

### Sifat Kimia Gelatin

Sifat kimia gelatin dari tulang kambing Kacang ditunjukkan pada Tabel 1.

Kadar abu gelatin tulang scapula sapi aceh, yang dilaporkan Jelita *et al.* (2018) adalah 4,67% dan Abedinia *et al.* (2017) melaporkan 2,1% untuk gelatin kaki bebek peking dengan perlakuan awal menggunakan pepsin.

**Kadar air.** Penambahan bromelin 15 U menghasilkan kadar air gelatin tertinggi ( $P < 0,05$ ) adalah 9,90%, dan menurun ketika konsentrasi bromelin 20 U (GB-3). Penambahan bromelin diduga menyebabkan perubahan ikatan hidrogen jaringan gelatin yang terbentuk dari molekul air, menjadi terpotong-potong membentuk fraksi kecil. Hal tersebut lebih jelas ditunjukkan pada bentuk morfologi gelatin GB-3 dengan struktur tidak kompak dengan banyak rongga yang terbentuk (Gambar 3), sehingga lebih tinggi penguapan permukaan. Air adalah salah satu



komponen pembentuk struktur gelatin, karena molekul air terlibat dalam ikatan hidrogen dari jaringan gelatin, perubahan struktur jaringan gelatin, akibat perlakuan yang diterapkan mempengaruhi komponen pembentuk jaringan gelatin (Guo *et al.*, 2003). Kadar air gelatin dari limbah pengolahan surimi dengan perlakuan bromelin yang dilaporkan Norziah *et al.* (2014) adalah 5,8%.

**Kadar Lemak.** Lemak tulang dihilangkan saat perlakuan awal sebelum langkah ekstraksi gelatin dilakukan. Semakin rendah kadar lemak, menunjukkan pembuangan lemak tulang telah dilakukan secara efisien (See *et al.*, 2011). Hasil penelitian menunjukkan bahwa, perlakuan enzim berpengaruh nyata menurunkan kadar lemak gelatin dibanding tanpa bromelin ( $P < 0,05$ ). Rendahnya kadar lemak gelatin dengan penambahan enzim diduga karena langkah proses ekstraksi yang efisien. Perlakuan awal terhadap tulang, Inkubasi dengan enzim pada konsentrasi dan waktu yang tepat, berkontribusi pada pemisahan lemak yang menghasilkan kandungan lemak yang lebih rendah dalam produk akhir (Ktari *et al.*, 2014).

Kadar lemak berbeda dari gelatin kulit ikan mas (*Cyprinus carpio*) yang dilaporkan Tkaczewska *et al.* (2018), dengan perlakuan awal asam dan alkali, masing-masing adalah 10,02 dan 9,82%.

**Kadar Protein.** Penambahan bromelin nyata meningkatkan kadar protein gelatin ( $P < 0,05$ ) dibanding tanpa bromelin. Kadar protein tertinggi, ditunjukkan gelatin dengan penambahan bromelin 15 U (GB-2) adalah 71,92%. Hidrolisis sempurna terjadi pada konsentrasi enzim yang tepat dengan ketersediaan substrat. *Stem* bromelin memiliki kemampuan memutus ikatan peptida molekul protein dan melepaskan berbagai asam amino dan turunannya seperti amina, asam karboksilat dan enzim bebas, tergantung kelarutan substrat (Rawon *et al.*, 1990).

Penambahan bromelin sampai 20 U (GB-3) menurunkan kadar protein gelatin. Hal yang sama pada gelatin dari kulit kelinci (*Siganus canaliculatus*) yang dilaporkan Haryati *et al.* (2019) bahwa, kadar protein tertinggi pada perlakuan bromelin 1% yaitu 94,72%, dan menurun menjadi 91,21%, ketika konsentrasi bromelin ditambahkan sampai 1,5%. Penurunan kadar protein diduga karena konsentrasi enzim bromelin yang tinggi mampu mendegradasi struktur protein menjadi gelatin tetapi pada konsentrasi tertentu, bromelin tidak lagi mendegradasi struktur protein melainkan mendenaturasi protein yang mengakibatkan penurunan kadar protein.

**pH.** Nilai pH gelatin penting diketahui, karena dapat membatasi penggunaan saat diaplikasikan pada produk. Perlakuan bromelin nyata menurunkan pH gelatin ( $P < 0,05$ ), dan tidak berbeda pada konsentrasi bromelin ( $P > 0,05$ ).

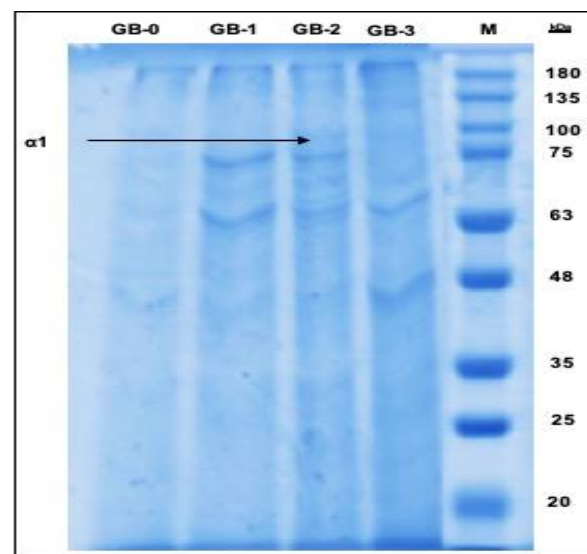
Tingginya nilai pH pada gelatin tanpa perlakuan enzim diduga karena akumulasi zat kimia saat demineralisasi yang tidak tercuci sempurna saat netralisasi. Proses demineralisasi menggunakan EDTA-2Na pH 7,5 selama lima hari dengan penggantian larutan

perendaman setiap 12 jam, yang terakumulasi pada tulang sebelum diekstraksi. Berbeda dengan gelatin dengan perlakuan bromelin menghasilkan pH yang lebih rendah, diduga karena enzim membantu proses denaturasi kolagen menjadi gelatin dengan cepat mencapai akhir ekstraksi, sehingga pH awal ekstraksi dan zat anorganik perlakuan awal telah terurai disebabkan penguraian gugus amino yang dilepaskan dari pemutusan ikatan peptida (Alemán *et al.*, 2011)

Nilai pH yang berbeda dilaporkan Al-Kahtani *et al.* (2017) pada gelatin tulang unta dengan demineralisasi asam yaitu 5,3, dan gelatin sirip dan sisik limbah ikan ekstraksi dengan protease alkali adalah 6,17 (Mirzapour-kouhdasht *et al.*, 2018). Standar mutu gelatin untuk aplikasi ke makanan adalah 3,8 – 6,0 untuk gelatin tipe A dan 5,0 – 7,5 untuk gelatin tipe B (SNI, 1995; GMIA, 2012).

### Sifat Fisik Gelatin

**Pola distribusi molekul.** Distribusi molekul protein gelatin hasil analisis SDS-PAGE ditunjukkan pada Gambar 2. Pola pita polipeptida gelatin dengan bromelin mengandung rantai  $\alpha 1$  dengan berat molekul 31,00 – 91,12 kDa dari persamaan linier  $y = -1,001x + 2,764$ .



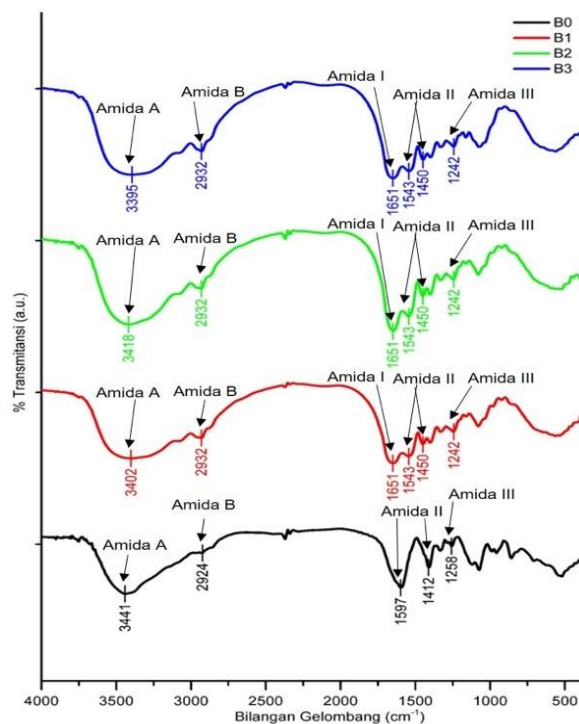
Gambar 2. Pola Distribusi Berat Molekul Protein Gelatin Tulang Kacang

Hasil menunjukkan bahwa, terjadi degradasi rantai polipeptida secara progresif dengan penambahan bromelin. Rantai  $\alpha$  intensitas rendah diamati pada GB-3, sedangkan keberadaan rantai  $\alpha$  terlihat samar pada GB-1 dan GB-2. Ahmad *et al.* (2020) menemukan bahwa gelatin dengan bromelin menghasilkan pita protein rendah yang mengarah ke pembentukan peptida dengan berat molekul sekitar 60 kDa. Hasil yang mirip dengan gelatin kulit sapi perlakuan papain, tidak ditemukan rantai  $\beta$  dan  $\alpha$ , tetapi peptida dengan berat molekul rendah jelas terlihat (Ahmad *et al.*, 2019). Abedinia *et al.* (2017) melaporkan bahwa terjadi

penurunan intensitas pita rantai  $\alpha 1$  dan  $\alpha 2$ , serta pembentukan fraksi peptida dengan berat molekul rendah pada ekstraksi gelatin kaki bebek dengan pepsin dibanding dengan asam atau basa.

Proses inkubasi enzim dengan air suling selama 48 jam dan dilanjutkan ekstraksi 3 jam juga diduga sebagai faktor lain penyebab degradasi polipeptida berat molekul tinggi menjadi fraksi dengan berat molekul rendah. Zhang *et al.* (2018) menyatakan bahwa, perlakuan enzimatis yang lebih lama menyebabkan hidrolisis rantai peptida yang lebih ekstensif menjadi peptida.

**Profil gugus fungsional (FTIR).** Spektroskopi biasanya digunakan untuk melihat gugus fungsional dan struktur sekunder protein gelatin, dan lokasi tepatnya tergantung pada ikatan hidrogen dan konfigurasi struktur protein (Cebi *et al.*, 2016). Profil gugus fungsional gelatin ditunjukkan pada Gambar 3.



Gambar 3. Spektroskopi Fourier Transform Infrared (FTIR) Gelatin Tulang Kambing Kacang

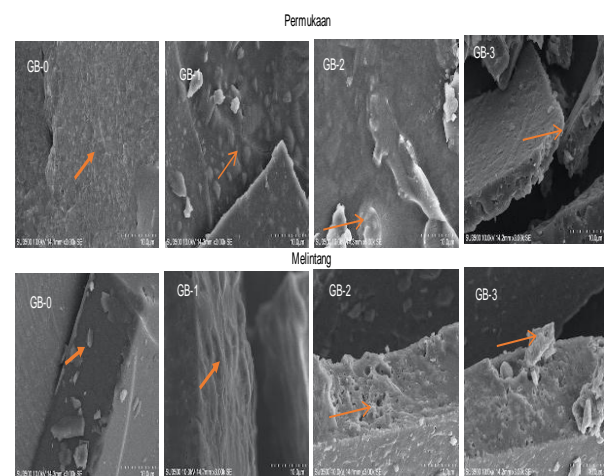
Pita amida A muncul pada sampel GB-0, GB-1, GB-2 dan GB-3 dengan bilangan gelombang masing-masing 3441, 3402, 3418 dan 3395  $\text{cm}^{-1}$ . Hasil menunjukkan bahwa pita bergeser ke bilangan gelombang lebih rendah dengan frekuensi yang lebih tinggi diamati pada GB-3, menunjukkan degradasi protein lebih lanjut karena penambahan bromelin.

Pita amida B gelatin GB-0 direkam pada bilangan gelombang 2924  $\text{cm}^{-1}$ , sedangkan GB-1, GB-2 dan GB-3 pada bilangan gelombang yang sama yaitu 2932  $\text{cm}^{-1}$ . Pita amida B gelatin kulit sapi dengan bromelin yang dilaporkan Ahmad *et al.* (2020) pada bilangan gelombang 2937,59  $\text{cm}^{-1}$ . Bilangan gelombang yang relatif lebih rendah pada GB-0 menunjukkan

interaksi yang lebih besar dari kelompok  $-\text{NH}_3$  antara rantai peptida (Ahmad & Benjakul, 2011).

Pita Amida I gelatin perlakuan bromelin dengan bilangan gelombang yang sama yaitu 1651  $\text{cm}^{-1}$ , dan intensitas tinggi diamati pada gelatin GB-2. Hal ini berarti bahwa semua gelatin dengan penambahan enzim menunjukkan pembentukan struktur sekunder protein gelatin. Cao *et al.* (2020) melaporkan fraksi protein struktur sekunder gelatin tulang sapi dari pita amida I terdapat pada frekuensi antara 1700 – 1600  $\text{cm}^{-1}$ .

**Morfologi gelatin.** Morfologi gelatin tulang kambing Kacang melalui hasil *scanning electron micrograph* (SEM) pada bagian permukaan datar dan melintang gelatin ditunjukkan pada Gambar 4.



Gambar 4. Morfologi Gelatin Tulang Kambing Kacang

Hasil *scanning* menunjukkan struktur gel yang lebih halus, kompak dengan rongga yang lebih kecil pada gelatin GB-1 dan GB-2. Ahmad *et al.* (2020) menyatakan bahwa, mikrostruktur gelatin dengan ukuran partikel yang lebih besar dan jaringan gelatin yang relatif lebih padat dengan jumlah ruang kosong tidak beraturan yang lebih sedikit.

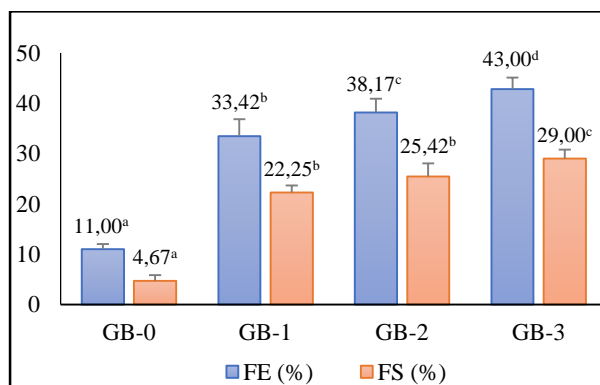
Selanjutnya ketika konsentrasi bromelin ditambahkan sampai 20 U, morfologi gelatin tampak kasar dengan pori yang besar. Hal tersebut diduga terjadi proses degradasi protein lanjut yang menyebabkan kerusakan gel gelatin dengan meningkatnya konsentrasi bromelin, yang ditunjukkan pada profil distribusi molekul protein dengan SDS-PAGE (Gambar 2). Xu *et al.* (2016) menyatakan bahwa selama denaturasi, molekul kolagen dipecah menjadi potongan-potongan kecil, dengan hidrolisis lebih lanjut menyebabkan tripel heliks menjadi heliks tunggal.

### Sifat Fungsional Gelatin

Sifat fungsional gelatin yang berhubungan dengan pembentukan permukaan molekul gelatin meliputi: *foaming expansion* (FE) dan *foaming stability* (FS) serta kapasitas dan stabilitas emulsi.

**Foaming expansion (FE) dan foaming stability (FS) gelatin.** FE dan FS gelatin ditunjukkan pada Gambar 5. Perlakuan bromelin berpengaruh nyata

terhadap FE dan FS gelatin, dan meningkat dengan bertambahnya konsentrasi bromelin ( $P < 0,05$ ). Selanjutnya ketika gelatin didiamkan 20 menit, *foam* semua gelatin menjadi tidak stabil dan menurun. Ktari *et al.* (2014) melaporkan hal yang sama pada gelatin kulit ikan yang diekstraksi menggunakan protease kasar dari jeroan *Salaria basilisca* pada berbagai konsentrasi dengan nilai FE mulai dari 12,33% meningkat menjadi 108,83% dan FS 5,85 menjadi 36,80% seiring dengan meningkatnya konsentrasi enzim, yang mungkin disebabkan ukuran protein yang lebih pendek karena degradasi enzim sehingga lebih cepat menyerap permukaan emulsi. Morales *et al.* (2015) menambahkan bahwa, laju adsorpsi protein ke *interfacial* ditentukan oleh ukuran partikel molekul protein, dimana semakin rendah ukuran partikel, semakin cepat protein dapat menyerap ke *interfacial* udara-air, sekalipun dengan kadar protein yang rendah.



Gambar 5. Sifat *Foaming* Gelatin Tulang Kambing Kacang Perlakuan Bromelin  
a,b,c,d Superskrip yang berbeda menunjukkan berbeda nyata ( $P < 0,05$ )

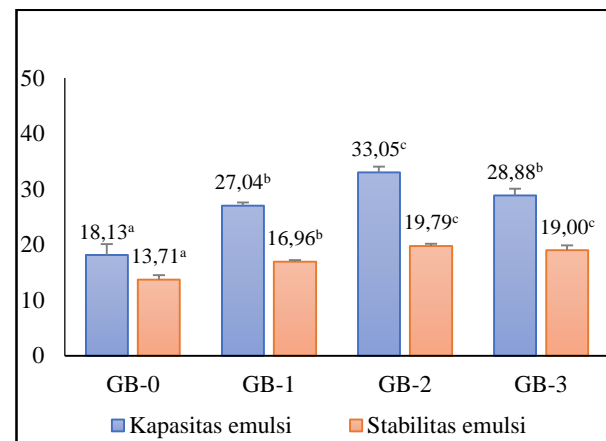
Penelitian Chen *et al.* (2017) terhadap sifat *interfacial* dan *foaming* pada misel kasein asli dan misel kasein terdispersi, membuktikan bahwa, walaupun konsentrasi protein misel kasein jauh lebih rendah, dibanding misel kasein terdispersi, namun mampu menghasilkan struktur *interfacial* yang lebih padat dan lebih homogen, dengan ketahanan yang lebih tinggi terhadap tekanan. Hal ini menjelaskan bahwa dengan konsentrasi protein yang lebih rendah dibanding gelatin GB-2 (Tabel 1), namun gelatin GB-3 menghasilkan sifat *foaming* (FE dan FS) yang lebih tinggi.

#### Kapasitas dan stabilitas emulsi gelatin.

Kapasitas dan stabilitas emulsi gelatin ditunjukkan pada Gambar 6. Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa, penambahan bromelin berpengaruh nyata ( $P < 0,05$ ) terhadap sifat emulsi gelatin.

Gelatin tanpa perlakuan bromelin (GB-0) menunjukkan nilai kapasitas emulsi terendah adalah 18,13% dan pada penambahan bromelin 15 U (GB-2) menghasilkan kapasitas emulsi tertinggi 33,05% ( $P < 0,05$ ), dan menurun pada konsentrasi 20 U (GB-3). Kecenderungan ini mirip dengan gelatin ikan mas perak (Xu *et al.*, 2021). Inkubasi selama 48 jam dengan

penambahan konsentrasi enzim, diduga menjadi penyebab menurunnya kapasitas emulsi gelatin GB-3. Chakka *et al.* (2017) menyatakan bahwa, protein yang sangat teroksidasi akibat penambahan bromelin penyebab menurunnya kapasitas emulsi.



Gambar 6. Sifat Emulsi Gelatin Tulang Kambing Kacang Perlakuan Bromelin  
a,b,c,d Superskrip yang berbeda menunjukkan berbeda nyata ( $P < 0,05$ )

Stabilitas emulsi gelatin dengan bromelin menunjukkan bahwa, pada tingkat kapasitas tertinggi, pada gelatin GB-2 memiliki stabilitas emulsi yang tidak berbeda dengan GB-3 ( $P > 0,05$ ), yaitu masing-masing 19,79% dan 19,00%, yang menunjukkan bahwa, penambahan konsentrasi bromelin sampai 20 U, tidak berpengaruh terhadap stabilitas emulsi. Surówka *et al.* (2004) menyatakan bahwa, proteolisis dapat menghasilkan peningkatan sifat pengemulsi, tetapi peningkatan rasio enzim terhadap reaksi protein dalam campuran, menyebabkan ketidakstabilan sifat pengemulsi, terutama ketika proteolisis dilakukan untuk waktu yang lama.

## KESIMPULAN

Disimpulkan (1) bromelin dapat digunakan membantu ekstraksi tulang kambing Kacang untuk menghasilkan gelatin, dan (2) konsentrasi bromelin 15 U/g tulang kambing Kacang, efektif menghasilkan gelatin dengan sifat fisiokimia dan fungsional yang baik untuk aplikasi ke pangan.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abedinia, A., Ariffin, F., Huda, N., & Nafchi, A. M. (2017). Extraction and characterization of gelatin from the feet of Pekin duck (*Anas platyrhynchos domestica*) as affected by acid, alkaline, and enzyme pretreatment. *International journal of biological macromolecules*, 98, 586-594.
- Ahmad, M., & Benjakul, S. (2011). Characteristics of gelatin from the skin of unicorn leatherjacket



- (Aluterus monoceros) as influenced by acid pretreatment and extraction time. *Food Hydrocoll.*, 25(3), 381 – 388.
- Ahmad, T., Ismail, A., Ahmad, S. A., Khalil, K. A., Awad, E. A., Leo, T. K., Imlan, J. C., & Sazili, A. Q. (2018). Characterization of gelatin from bovine skin extracted using ultrasound subsequent to bromelain pretreatment. *Food hydrocolloids*, 80, 264-273.
- Ahmad, T., Ismail, A., Ahmad, S. A., Khalil, K. A., Teik Kee, L., Awad, E. A., & Sazili, A. Q. (2019). Physicochemical characteristics and molecular structures of gelatin extracted from bovine skin: effects of actinidin and papain enzymes pretreatment. *International Journal of Food Properties*, 22(1), 138-153.
- Ahmad, T., Ismail, A., Ahmad, S. A., Khalil, K. A., Kee, L. T., Awad, E. A., & Sazili, A. Q. (2020). Extraction, characterization and molecular structure of bovine skin gelatin extracted with plant enzymes bromelain and zingibain. *Journal of food science and technology*, 57, 3772-3781.
- Alemán, A., Giménez, B., Gómez-Guillén, M. C., & Montero, P. (2011). Enzymatic hydrolysis of fish gelatin under high pressure treatment. *International journal of food science & technology*, 46(6), 1129-1136.
- Al-Hassan, A. A. (2020). Gelatin from camel skins: Extraction and characterizations. *Food Hydrocolloids*, 101, 105457.
- Ali, E., Sultana, S., Hamid, S. B. A., Hossain, M., Yehya, W. A., Kader, A., & Bhargava, S. K. (2016). Gelatin controversies in food, pharmaceuticals, and personal care products: Authentication methods, current status, and future challenges. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 58, 1495 – 1511.
- Al-Kahtani, H. A., Jaswir, I., Ismail, E. A., Ahmed, M. A., Monsur Hamed, A., Olorunnisola, S., & Octavianti, F. (2017). Structural characteristics of camel-bone gelatin by demineralization and extraction. *International journal of food properties*, 20(11), 2559-2568.
- Amid, A., Ismail, N. A., Yusof, F., & Salleh, H. M. (2011). Expression, purification, and characterization of a recombinant stem bromelain from *Ananas comosus*. *Process Biochemistry*, 46(12), 2232-2239.
- AOAC. (2000). *Official Methods of Analysis*. 15<sup>th</sup> Edition. Virginia-USA: Inc, ed.
- Bichukale, A. D., Koli, J. M., Sonavane, A. E., Vishwasrao, V. V., Pujari, K. H., & Shingare, P. E. (2018). Functional properties of gelatin extracted from poultry skin and bone waste. *Int. J. Pure Appl. Biosci*, 6(4), 87-101.
- Cao, S., Wang, Y., Xing, L., Zhang, W., & Zhou, G. (2020). Structure and physical properties of gelatin from bovine bone collagen influenced by acid pretreatment and pepsin. *Food and Bioproducts Processing*, 121, 213-223.
- Cebi, N., Durak, M. Z., Toker, O. S., Sagdic, O., & Arici, M. (2016). An evaluation of Fourier transforms infrared spectroscopy method for the classification and discrimination of bovine, porcine and fish gelatins. *Food chemistry*, 190, 1109-1115.
- Chakka, A. K., Muhammed, A., Sakhare, P. Z., & Bhaskar, N. (2017). Poultry processing waste as an alternative source for mammalian gelatin: Extraction and characterization of gelatin from chicken feet using food grade acids. *Waste and Biomass Valorization*, 8, 2583-2593.
- Chen, M., Sala, G., Meinders, M. B., van Valenberg, H. J., van der Linden, E., & Sagis, L. M. (2017). Interfacial properties, thin film stability and foam stability of casein micelle dispersions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 149, 56-63.
- Chuaychan, S., Benjakul, S., & Nuthong, P. (2016). Element distribution and morphology of spotted golden goatfish fish scales as affected by demineralisation. *Food chemistry*, 197, 814-820.
- Gelatin Manufacturers Institute of America (GMIA). (2012). *Gelatin Handbook*. Page 1 – 25. America.
- Guo, L., Colby, R. H., Lusignan, C. P., & Whitesides, T. H. (2003). Kinetics of triple helix formation in semidilute gelatin solutions. *Macromolecules*, 36(26), 9999-10008.
- Haryati, D., Nadhifa, L., & Abdullah, N. (2019, November). Extraction and characterization of gelatin from rabbitfish skin (*Siganus canaliculatus*) with enzymatic method using bromelin enzyme. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 355, No. 1, p. 012095). IOP Publishing.
- Jongjareonrak, A., Benjakul, S., Visessanguan, W., Prodpran, T., & Tanaka, M. (2006). Characterization of edible films from skin gelatin of brownstripe red snapper and bigeye snapper. *Food Hydrocolloids*, 20(4), 492-501.
- Jelita, J., Wirjosentono, B., Tamrin, T., & Marpaung, L. (2018, December). Characterization of gelatin from scapula (Os scapula) from Aceh cattle. In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 2049, No. 1). AIP Publishing.
- Kołodziejska, I., Skierka, E., Sadowska, M., Kołodziejski, W., & Niecikowska, C. (2008). Effect of extracting time and temperature on yield of gelatin from different fish offal. *Food Chemistry*, 107(2), 700-706.
- Ktari, N., Bkhairia, I., Jridi, M., Hamza, I., Riadh, B. S., & Nasri, M. (2014). Digestive acid protease from zebra blenny (*Salaria basilisca*): Characteristics and application in gelatin extraction. *Food research international*, 57, 218-224.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nat. Publ. Gr.*, 228, 726-734.
- Ling ling, G., W. Zhen-yu, L. Zheng, Z. Cai-xia, & Z.



- De-quan. (2018). The characterization of acid and pepsin soluble collagen from ovine bones (Ujumuqin sheep). *J. Integr. Agric.*, 17, 704–711.
- Liu, D, Liang, L, Regenstein, J. M., & Zhou, P. (2012). Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from fins, scales, skins, bones and swim bladders of bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*). *Food Chemistry*, 133, 1441-1448.
- Ma, Y., Zeng, X., Ma, X., Yang, R., & Zhao, W. (2019). A simple and eco-friendly method of gelatin production from bone: One-step biocatalysis. *Journal of Cleaner Production*, 209, 916-926.
- Mariod, A. A., & Fadul, H. (2015). Extraction and characterization of gelatin from two edible Sudanese insects and its applications in ice cream making. *Food Science and Technology International*, 21(5), 380-391.
- Matulesy, D. N., Erwanto, Y., Nurliyani, N., Suryanto, E., Abidin, M. Z., & Hakim, T. R. (2021). Characterization and functional properties of gelatin from goat bone through alcalase and neutrase enzymatic extraction. *Veterinary World*, 14(9), 2397.
- Mirzapour-kouhdasht, A., Moosavi-Nasab, M., & Aminlari, M. (2018). Gelatin production using fish wastes by extracted alkaline protease from *Bacillus licheniformis*. *J Food Sci Technol*, 55(12), 5175 – 5180.
- Morales, R., Martínez, K. D., Ruiz-Henestrosa, V. M. P., & Pilosof, A. M. (2015). Modification of foaming properties of soy protein isolate by high ultrasound intensity: Particle size effect. *Ultrasonics Sonochemistry*, 26, 48-55.
- Ninpetch, U., Tsukada, M., & Promboon, A. (2015). Mechanical properties of silk fabric degummed with bromelain. *Journal of Engineered Fibers and Fabrics*, 10(3), 155892501501000319.
- Norziah, M. H., Kee, H. Y., & Norita, M. (2014). Response surface optimization of bromelain-assisted gelatin extraction from surimi processing wastes. *Food Bioscience*, 5, 9-18.
- Ramli, A. N. M., Manas, N. H. A., Hamid, A. A. A., Hamid, H. A., & Illias, R. M. (2018). Comparative structural analysis of fruit and stem bromelain from *Ananas comosus*. *Food chemistry*, 266, 183-191.
- Renuka, V., Ravishankar, C. N. R., Zynudheen, A. A., Bindu, J., & Joseph, T. C. (2019). Characterization of gelatin obtained from unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*) and reef cod (*Epinephelus diacanthus*) skins. *Lwt-Food Sci Technol.*, 116 (108586), 1-8.
- Rowan, A. D., Buttle, D. J., & Barrett, A. J. (1990). The cysteine proteinases of the pineapple plant. *Biochemical Journal*, 266(3), 869.
- Samsudin, F. S., Aminal'lah, N., Zain, F. A. M., Kamarudin, A. S., Marlida, Y., & Huda, N. (2018). Physicochemical properties of quail bone gelatin extract with hydrochloric acid and citric acid. *Journal of Agrobiotechnology*, 9(1S), 92-101.
- São Paulo Barretto Miranda, Í.K., A. Fontes Suzart Miranda, F.V.D. Souza, M.A. Vannier-Santos, C.P. Pirovani, I.M. Pepe, I.J. Rodowanski, K.T. de S.E. Ferreira, L. Mendes Souza Vaz, and S.A. de Assis. 2017. The biochemical characterization, stabilization studies and the antiproliferative effect of bromelain against B16F10 murine melanoma cells. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 68, 442–454.
- See, S.F., L.L. Hoo, and A.S. Babji. 2011. Optimization of enzymatic hydrolysis of Salmon (*Salmo salar*) skin by Alcalase. *Int. Food Res. J.*, 18, 1359–1365.
- Standar Nasional Indonesia (SNI). (1995). *Mutu dan cara uji gelatin*. Jakarta: Badan Standardisasi Nasional SNI 01- 3735.
- Surówka, K., Żmudziński, D., Fik, M., Macura, R., & Łasocha, W. (2004). New protein preparations from soy flour obtained by limited enzymic hydrolysis of extrudates. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 5(2), 225-234.
- Tkaczewska, J., Morawska, M., Kulawik, P., & Zajac, M. (2018). Characterization of carp (*Cyprinus carpio*) skin gelatin extracted using different pretreatments method. *Food Hydrocolloids*, 81, 169-179.
- Tümerkan, E. T. A., Cansu, Ü., Boran, G., Mac Regenstein, J., & Özoğul, F. (2019). Physicochemical and functional properties of gelatin obtained from tuna, frog and chicken skins. *Food Chemistry*, 287, 273-279.
- Xu, M., Wei, L., Xiao, Y., Bi, H., Yang, H., & Du, Y. (2017). Physicochemical and functional properties of gelatin extracted from Yak skin. *International journal of biological macromolecules*, 95, 1246-1253.
- Xu, J., Zhang, T., Zhang, Y., Yang, L., Nie, Y., Tao, N., ... & Zhong, J. (2021). Silver carp scale gelatins for the stabilization of fish oil-loaded emulsions. *International journal of biological macromolecules*, 186, 145-154.
- Zarei, M., Mazaheri Tehrani, M., Rashidi, H., & Fathi Najafi, M. (2019). Optimization of Gelatin Extraction Process, from Sheep Skin Waste Using Alcalase Enzyme by Response Surface Method. *Research and Innovation in Food Science and Technology*, 8(2), 125-136.
- Zhang, Y., Dutilleul, P., Orsat, V., & Simpson, B. K. (2018). Alcalase assisted production of novel high alpha-chain gelatin and the functional stability of its hydrogel as influenced by thermal treatment. *International journal of biological macromolecules*, 118, 2278-2286.