

**ISOLASI DAN PROFIL PROTEIN KOLAGEN SISIK IKAN GABUS  
(*Channa striata*) DENGAN ENZIM BROMELAIN**

**SKRIPSI**

oleh  
**JIRA FOURINDAH DESKARTESY HUMA**  
**145090107111006**



**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2018**



**ISOLASI DAN PROFIL PROTEIN KOLAGEN SISIK IKAN  
GABUS (*Channa striata*) DENGAN ENZIM BROMELAIN**

**SKRIPSI**

**Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains  
dalam Bidang Biologi**

oleh  
**JIRA FOURINDAH DESKARTESY HUMA**  
**145090107111006**



**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2018**

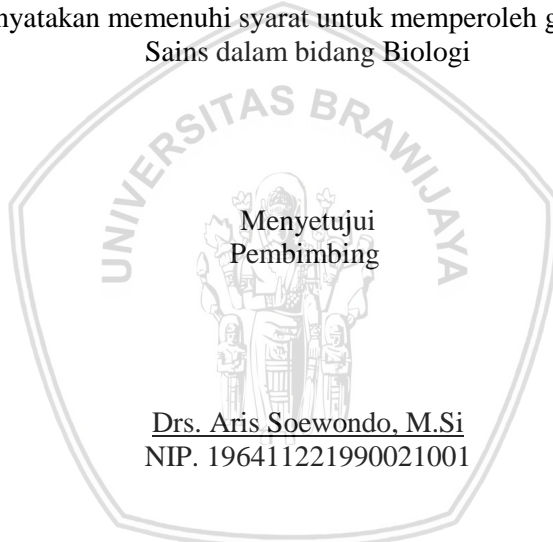


## HALAMAN PENGESAHAN SKRIPSI

### ISOLASI DAN PROFIL PROTEIN KOLAGEN SISIK IKAN GABUS (*Channa striata*) DENGAN ENZIM BROMELAIN

**JIRA FOURINDAH DESKARTESY HUMA**  
**145090107111006**

Telah dipertahakan di depan Majelis Penguji  
pada tanggal 16 Juli 2018  
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar sarjana  
Sains dalam bidang Biologi



Menyetujui  
Pembimbing

Drs. Aris Soewondo, M.Si  
NIP. 196411221990021001

Mengetahui  
Ketua Program Studi S-1 Biologi  
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Rodiyati Azrianingsih, S.Si., M.Sc., Ph.D.  
NIP. 197001281994122001



## HALAMAN PERNYATAAN SKRIPSI

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Jira Fourindah Deskarteszy Huma  
NIM : 145090107111006  
Jurusan : Biologi  
Penulis Skripsi Berjudul : Isolasi Dan Profil Protein Kolagen  
Sisik Ikan Gabus (*Channa striata*)  
Dengan Enzim Bromelain

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Skripsi ini adalah benar-benar karya saya sendiri dan bukan hasil plagiat dari karya orang lain. Karya-karya yang tercantum dalam Daftar Pustaka Skripsi ini semata-mata digunakan sebagai acuan atau referensi
2. Apabila kemudian hari diketahui bahwa isi Skripsi saya merupakan hasil plagiat, maka saya bersedia menanggung akibat hukum dari keadaan tersebut

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran

Malang, 23 Juli 2018  
Yang menyatakan

Jira Fourindah Deskarteszy Huma  
145090107111006

## PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipannya hanya dapat dilakukan seizin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.





## Isolasi Dan Profil Peptida Kolagen Sisik Ikan Gabus (*Channa Striata*) Dengan Enzim Bromelain

Jira Fourindah Deskartesyy Huma, Aris Soewondo  
Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,  
Universitas Brawijaya, Malang  
2018

### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh lama *pretreatment* alkali terhadap konsentrasi kolagen sisik ikan Gabus (*C. striata*) hasil ekstraksi dengan enzim bromelain dan profil protein kolagen tersebut. *Pretreatment* alkali dilakukan dengan perendaman sisik pada larutan NaOH 0,1 M selama 6 jam (P1) dan 72 jam (P2), kemudian dilanjutkan dengan dekalsifikasi menggunakan larutan EDTA 0,5 M selama 24 jam pada suhu 4 °C. Selanjutnya, dilakukan ekstraksi kolagen dengan enzim bromelain (1 g sisik/ 10 mL bromelain). Hasil ekstraksi dari masing-masing perlakuan kemudian dibagi menjadi dua kelompok, yakni *freeze dry* dan *non freeze dry*. Ekstrak sisik ikan Gabus dari kelompok *non freeze dry* dipresipitasi terlebih dahulu, kemudian kedua kelompok sampel diukur konsentrasinya dengan metode Bradford pada panjang gelombang 630 nm. Selanjutnya dilakukan analisis SDS-PAGE menggunakan 8% *separating gel* untuk mengetahui profil protein yang didapatkan dari sisik ikan Gabus. Data konsentrasi protein kemudian dianalisis menggunakan uji *Independent Sample T-test* pada SPSS 22.0. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak kolagen P1 memiliki konsentrasi lebih tinggi dibandingkan P2, baik pada sampel *freeze dry* maupun *non freeze dry*. Hasil separasi protein dengan SDS-PAGE menunjukkan adanya perbedaan pola *band* protein yang muncul pada sampel P1 dan P2. Sampel 1 menunjukkan adanya komponen rantai  $\alpha 1$  dan  $\alpha 2$  serta subunit  $\beta$  dan  $\gamma$ , sedangkan pada sampel P2 tidak terdeteksi adanya rantai  $\alpha$ . Keberadaan komponen rantai  $\alpha 1$  dan  $\alpha 2$  pada hasil ekstraksi tersebut merupakan kolagen tipe I, dengan komposisi rantai  $\alpha 1$  (125 KDa), dan  $\alpha 2$  (152 KDa).

Kata kunci: bromelain, *C. striata*, kolagen, sisik ikan

## Isolation and Protein Profile of Snakehead (*Channa striata*) Fish Scale Collagen by Bromelain Enzyme

Jira Fourindah Deskartesya Huma, Aris Soewondo  
Departement of Biology, Faculty of Mathematics and Natural  
Sciences, Brawjaya University, Malang  
2018

### ABSTRACT

The aims of this study are to determine the effect of alkaline pretreatment on collagen concentration and protein profile of Snakehead (*C. striata*) fish scales collagen extracted with bromelain enzyme. Alkali pretreatment was performed by soaking the scales on 0.1 M NaOH solution for 6 hours (P1) and 72 hours (P2), followed by decalcification using 0.5 M EDTA solution for 24 hours at 4°C. After that, the collagen extraction with bromelain enzyme (1 g of pretreated scales / 10 mL of bromelain) was performed. The extraction results from each treatment were then divided into freeze dry and non freeze dry group. The extract of Snakehead fish scales from the non freeze dry group was precipitated first, then the concentration of the two sample groups were measured in by Bradford method at 630 nm. Furthermore, SDS-PAGE analyzes with 8% separating gel to determine protein profile obtained from Snakehead fish scales was performed. Protein concentration data were further analysed using Independent Sample T-test in SPSS 22.0. The results of this study showed that P1 had higher collagen concentrations than P2, both in freeze dry and non freeze dry samples. The result of protein separation with SDS-PAGE showed the difference of protein band pattern that appeared on P1 and P2. The presence of  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  chain components as well as  $\beta$  and  $\gamma$  subunits were detected in P1, whereas in P2, no  $\alpha$  chain is detected. The presence of the  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  chain components in the extract of Snakehead (*C. striata*) fish scale using bromelain enzyme showed that the collagen obtained was type collagen I, with  $\alpha 1$  (125 KDa), and  $\alpha 2$  (152 KDa) chain composition.

Keywords: bromelain, collagen, *C. striata*, , fish scale

## KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa atas segala berkat dan penyertaan-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan naskah skripsi dengan sebaik-baiknya. Pada kesempatan ini, penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. Drs. Aris Soewondo, M.Si selaku dosen pembimbing yang selalu memberi saran dan semangat kepada penulis untuk menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi dengan baik
2. Prof. Widodo, S.Si, M.Si., Ph.D Med.Sc. selaku dosen pembimbing selama TKPS, yang selalu menginspirasi dan menyemangati penulis untuk mengembangkan ide penelitian
3. Prof. Muhaimin Rifa'i, Ph.D Med.Sc. dan Dr. Sri Widyarti selaku dosen penguji yang telah mendampingi, memberikan kritik dan saran bagi penelitian
4. Papa (Alm. Mengi Huma, S.Pd) dan Mama (Yuliana Lomi Rihi, BA), kakak-kakak terkasih (Kak Nara, Kak Era, Kak Mira, Kak Wendo, Kak Ogi), Gilbert, Gibran, Dinda, Tito, Oma Dota, dan seluruh keluarga atas dukungan moral dan materiil sehingga penulis dapat menempuh dan menyelesaikan pendidikan dengan penuh semangat
5. Angki, Joice, Kinan, Tiya, Shella, Fira, Jubjub, Dio, dan Innez yang selalu menyemangati penulis selama proses perkuliahan dan penelitian
6. Mbak Pantris, Mbak Sapti, Mas Bambang, Kak Yance, dan teman-teman Laboratorium Anatomi dan Fisiologi Hewan yang telah meluangkan waktu untuk berdiskusi dan membantu penulis selama penelitian di laboratorium
7. Teman-teman seperjuangan, AMINO 2014

Semoga Tuhan Yang Maha Esa memberikan balasan yang berlipat ganda pada seluruh pihak yang bersangkutan. Saran dan kritik yang membangun sangat diharapkan untuk menjadikan karya ini semakin bermanfaat.

Malang, Juli 2018

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>ABSTRAK</b> .....	<b>v</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>vi</b>
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	<b>vii</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>viii</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>x</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>xi</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	<b>xii</b>
<b>DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN</b> .....	<b>xiii</b>
<b>BAB I PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	2
1.3 Tujuan Penelitian .....	3
1.4 Manfaat Penelitian .....	3
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>4</b>
2.1 Struktur dan Tipe Kolagen.....	4
2.2 Sumber Kolagen.....	7
2.3 <i>Fish Collagen</i> .....	8
2.4 Metode Ekstraksi Kolagen .....	10
2.5 Enzim Bromelain .....	11
<b>BAB III METODE PENELITIAN</b> .....	<b>13</b>
3.1 Waktu dan Tempat .....	13
3.2 Ekstraksi Bromelain.....	13
3.3 Ekstraksi Kolagen Sisik Ikan .....	13
3.4 Pembuatan Kurva Standar Protein dan Uji Kuantitatif Protein.....	14
3.5 Analisis SDS-PAGE .....	14
3.6 Pembuatan Kurva Standard Berat Molekul Protein .....	15
3.7 Analisis Data .....	15
3.8 Kerangka Operasional.....	16
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	<b>17</b>

4.1 Pengaruh Lama Pre-Treatment Alkali terhadap Konsentrasi Kolagen ..... 17

4.2 Profil Protein Kolagen Hasil Ekstraksi Sisik Ikan Gabus dengan Enzim Bromelain..... 19

**BAB V KESIMPULAN DAN SARAN ..... 24**

5.1 Kesimpulan ..... 24

5.2 Saran..... 24

**DAFTAR PUSTAKA ..... 25**

**LAMPIRAN..... 30**



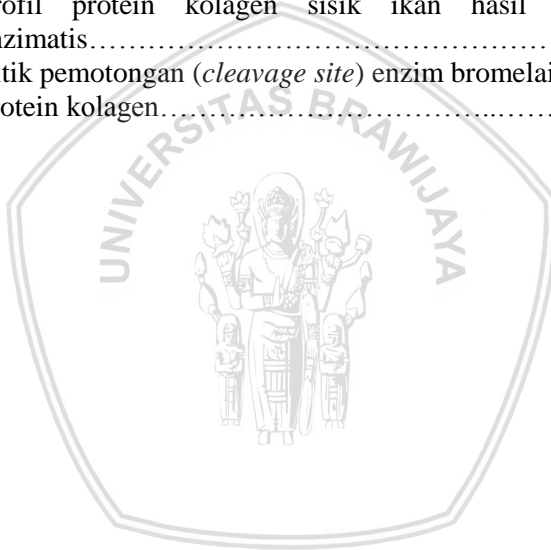
## DAFTAR TABEL

Nomor		Halaman
1	Struktur & susunan molekul berbagai tipe kolagen.....	6
2	Kolagen dari hewan laut.....	8
3	Komposisi asam amino kolagen sapid an tilapia.....	9
4	Pembuatan larutan standar BSA.....	14
5	Pengaruh proses freeze dry terhadap konsentrasi kolagen sisik ikan gabus ( <i>C. striata</i> ).....	20



## DAFTAR GAMBAR

Nomor		Halaman
1	Struktur triple heliks kolagen.....	4
2	Susunan rantai $\alpha$ pada molekul kolagen.....	5
3	Skema kerangka operasional penelitian.....	16
4	Pengaruh waktu pre-treatment NaOH terhadap konsentrasi kolagen sisik ikan gabus.....	18
4	Hasil separasi protein kolagen sisik ikan gabus ( <i>C. striata</i> ) dengan SDS-PAGE.....	21
5	Profil protein kolagen sisik ikan hasil ekstraksi enzimatis.....	22
6	Titik pemotongan ( <i>cleavage site</i> ) enzim bromelain pada protein kolagen.....	23



## DAFTAR LAMPIRAN

Nomor		Halaman
1	Metode Penelitian.....	31
2	Konsentrasi Protein Kolagen.....	32
3	Kurva Standar Berat Molekul Protein.....	33
4	Analisis Statistik.....	34





## DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN

<u>Simbol/Singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
ASC	<i>Acid Soluble Collagen</i>
BM	Berat Molekul
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
BSE	<i>Bovine Spongiform Encephalopathy</i>
ECM	<i>Extra Cellular Matrix</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>
ELISA	<i>Enyme-Linked Immunosorbant Assay</i>
FMD	<i>Foot &amp; Mouth Disease</i>
NaOH	Natrium hidroksida
pH	<i>power of Hydrogen</i>
PSC	<i>Pepsin Soluble Collagen</i>
Rf	<i>Retention factor</i>
Rpm	<i>Radian per minute</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulphate- Poliacrilamide Gel Electrophoresis</i>
TSE	<i>Transmissible Spongiform Encephalopathy</i>

<u>Simbol/Singkatan</u>	<u>Nama Unit</u>
%	persen
µg	mikrogram
µL	mikroliter
cm	<i>centimeter</i>
KDa	kiloDalton
M	Molar
mA	<i>miliampere</i>
mg	miligram
mL	mililiter
nm	nanometer
°C	derajat <i>celcius</i>
U	<i>Unit</i>
$\alpha$	<i>alpha</i>
$\beta$	<i>beta</i>
$\gamma$	<i>gamma</i>







# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Polimer bioaktif seperti kolagen, fibrin, gelatin, alginat, maupun selulosa telah banyak dimanfaatkan untuk keperluan berbagai bidang kehidupan, misalnya bidang pangan dan medis. Kolagen merupakan protein yang paling melimpah pada hewan, menyusun sepertiga dari total protein dalam tubuh. Kolagen merupakan protein struktural yang terdapat pada matriks ekstraseluler jaringan ikat pada hewan dan manusia. Kolagen terbentuk dari sel fibroblas pada jaringan ikat dan berbagai jenis sel epitel. Manfaat kolagen dalam bidang medis telah diketahui sejak lama. Penggunaan kolagen pada industri kosmetik maupun industri obat-obatan umumnya menggunakan kolagen dari hewan, seperti sapi dan babi. Sebagai contoh, kolagen dimanfaatkan untuk pemodelan kembali otot jantung pada penderita penyakit kardiovaskuler. Kolagen diketahui memiliki kemampuan untuk menginduksi apoptosis pada kultur sel (Ming dkk., 1998). Kolagen juga menjadi salah satu sumber pembuatan produk suplemen dan kosmetik (Mann dkk., 2015; Silvipriya dkk., 2015).

Kolagen pada sapi merupakan jenis polimer alami yang paling banyak digunakan dalam bidang medis, terutama sebagai bahan bersifat hemostatik untuk mengobati kerusakan jaringan. Kolagen sapi juga dijadikan sebagai obat regeneratif. Namun, sumber kolagen dari hewan mamalia, termasuk sapi dan babi, memiliki banyak kelemahan, antara lain mudah menimbulkan reaksi alergi dan tidak steril. Tidak sterilnya kolagen yang diambil dari mamalia dapat menimbulkan berbagai penyakit, misalnya infeksi zoonosis akut, termasuk *foot and mouth disease* (FMD), seperti *bovine spongiform encephalopathy* (BSE), *transmissible spongiform encephalopathy* (TSE), flu burung dan flu babi. Saat ini, sumber kolagen telah banyak beralih pada *marine collagen*, yakni kolagen dari kulit atau sisik (terkadang tulang) hewan laut (Yamada dkk., 2014; Silvipriya dkk., 2015). Keunggulan *marine collagen* jika dibandingkan dengan kolagen dari mamalia antara lain waktu ekstraksi yang dibutuhkan jauh lebih sedikit, namun menghasilkan produk atau hidrolisat kolagen yang lebih tinggi. Selain itu, ekstrak kolagen dari hewan laut

juga memiliki respon inflamasi yang lebih rendah, bersifat non imunogenik, dan bebas zoonosis (Silvipriya dkk., 2015).

Kolagen dari sisik ikan (*fish scale collagen*, FSC) menjadi salah satu jenis *marine collagen* yang saat ini banyak digunakan sebagai sumber kolagen (Bohan dkk., 2016). Penggunaan sisik ikan sebagai bahan baku untuk ekstraksi kolagen tidak hanya menguntungkan dari sisi lama waktu ekstraksi, namun juga dapat mengurangi limbah produk ikan yang umumnya tidak digunakan (Wulandari dkk., 2015). Umumnya, kolagen sisik ikan dapat diekstraksi menggunakan larutan asam (*acid soluble collagen*, ASC) dan enzim (*pepsin soluble collagen*, PSC). Penggunaan dua metode ekstraksi tersebut menghasilkan hasil yang berbeda, baik dari kuantitas maupun profil kolagen yang didapat. Metode PSC menurut Heu dkk. (2010) dapat menghasilkan kolagen lebih banyak dibandingkan ASC.

Ekstraksi kolagen secara enzimatik dapat dilakukan dengan enzim protease lain, umumnya papain, bromelain, tripsin, pancreatin, atau ficin (Neves dkk., 2016). Penggunaan bromelain dalam hidrolisis protein mampu menghasilkan total gugus  $\alpha$ -amino yang paling tinggi, jika dibandingkan dengan enzim protease lainnya, seperti alcalase dan neutrase (Hazlanisa dkk., 2010). Enzim bromelain merupakan enzim yang dapat ditemukan pada batang dan daging buah nanas (Mohan dkk., 2016). Ekstraksi menggunakan bahan alami seperti bromelain dari sari nanas dapat meningkatkan keamanan hasil ekstrak untuk digunakan dalam terapi kesehatan. Oleh karena itu, penelitian mengenai Isolasi dan Profil Protein Kolagen Sisik Ikan dengan Enzim Bromelain ini penting untuk dilaksanakan.

## 1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dari penelitian ini adalah:

1. Bagaimana pengaruh pre-treatment alkali terhadap konsentrasi hidrolisat kolagen sisik ikan Gabus hasil ekstraksi menggunakan enzim bromelain?
2. Bagaimana profil kolagen sisik ikan Gabus hasil ekstraksi menggunakan enzim bromelain?

### 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk:

1. Menganalisis pengaruh pre-treatment alkali terhadap konsentrasi hidrolisat kolagen sisik ikan Gabus hasil ekstraksi menggunakan enzim bromelain
2. Mengetahui profil kolagen sisik ikan Gabus hasil ekstraksi menggunakan enzim bromelain

### 1.4 Manfaat Penelitian

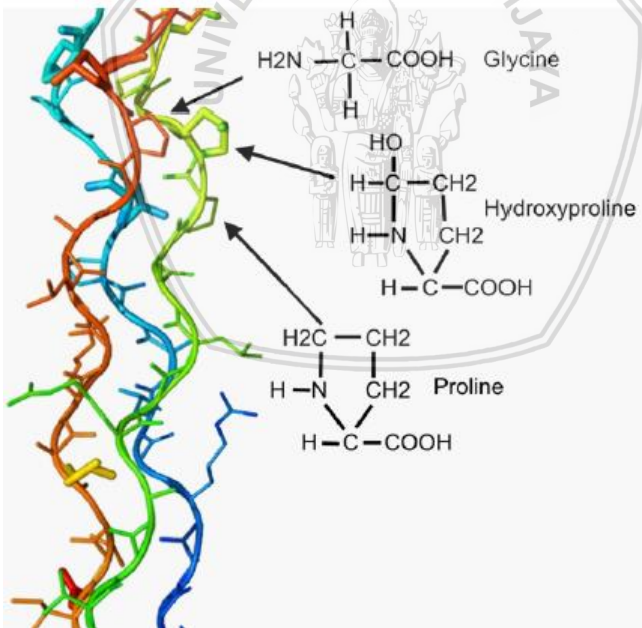
Manfaat dari penelitian ini adalah memberikan pengetahuan mengenai metode ekstraksi kolagen, terutama *fish scale collagen*, dan pengetahuan tersebut dapat menjadi dasar untuk penelitian-penelitian lebih lanjut.



## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Struktur dan Tipe Kolagen

Kolagen merupakan protein struktural utama dari jaringan ikat pada hewan. Umumnya, kolagen ditemukan di jaringan fibrosa, seperti tendon dan ligamen, juga pada kornea, kartilago, tulang, pembuluh darah, dan ruas tulang belakang. Unit struktural kolagen terdiri atas tiga rantai polipeptida yang tersusun secara *triple helix*, dengan dua rantai identik  $\alpha 1$  dan rantai  $\alpha 2$ . Setiap rantai memiliki 1050 asam amino yang terkait satu sama lain membentuk struktur *right handed helix* sepanjang 300 nm. Diameter kolagen adalah sekitar 1,5 nm, sedangkan berat molekulnya sekitar 300 kDa (Silvipriya dkk., 2015).

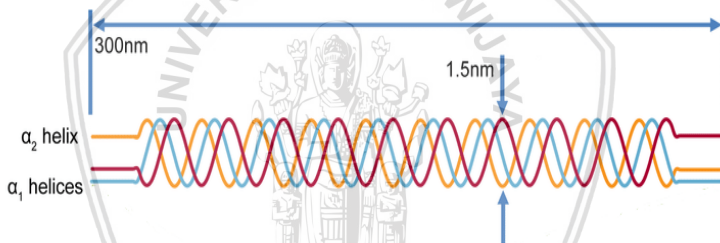


(Silvipriya dkk., 2015)

Gambar 1. Struktur triple heliks kolagen



Struktur kolagen membentuk motif yang terdiri dari repetisi Glisin-X-Y, dimana X dan Y dapat berupa gugus asam amino apa saja, namun yang paling umum dijumpai adalah prolin dan hidroksiprolin (Gambar 1). Asam amino X dan Y pada kolagen umumnya adalah (2S)-prolin (28%) dan (2S,4R)-4-hidroksiprolin (38%). Repetisi tersebut sama pada semua tipe kolagen, kecuali pada beberapa jenis kolagen *nonfibrillar*. Motif pada susunan kolagen terbentuk dari susunan paralel tiga rantai polipeptida dengan putaran *left-handed*, dan poliprolin tipe II (PPII) membentuk lipatan konformasi heliks dengan satu residu tersusun menurut putaran *right-handed*. Kolagen tersusun dalam bentuk heksagonal dan kuasi heksagonal, membentuk tipe serabut kolagen, disebut *microfibrillar*. Secara mikroskopis, kolagen terlihat berbentuk serabut memanjang (Silvipriya dkk., 2015).



(Canelon & Wallace, 2016)

Gambar 2. Susunan rantai  $\alpha$  pada molekul kolagen

Berdasarkan susunan asam aminonya, terdapat kurang lebih 28 tipe kolagen yang tersusun atas 46 rantai polipeptida berbeda. Protein-protein kolagen tersebut menyusun 25-35 % dari total massa protein pada mamalia. Perbedaan struktur pada tiap tipe kolagen bertujuan untuk *maintainance* integritas dan rigiditas jaringan, baik saat normal maupun saat mengalami *stretching* (Silvipriya dkk., 2015). Setiap tipe kolagen memiliki susunan molekul yang khas (Tabel 1). Umumnya kolagen memiliki struktur molekul heterodimer, atau memiliki tiga rantai  $\alpha$  berbeda (Gambar 2), namun



ada juga tipe kolagen yang bersifat homodimer, yang terdiri dari 3 rantai  $\alpha$  yang identik (Gelse dkk., 2003).

Tabel 1. Struktur dan susunan molekul berbagai tipe kolagen

Tipe kolagen	Struktur molekul	Susunan molekul
I	Heterotrimer	$[\alpha 1(I)]_2 \alpha 2(I)$
II	Homodimer	$[\alpha 1(II)]_3$
IV	Heterotrimer	$[\alpha 1(IV)]_2 \alpha 2(IV); \alpha 1- \alpha 6$
V	Heterotrimer	$\alpha 1(V), \alpha 2(V), \alpha 3(V)$
VI	Heterotrimer	$\alpha 1(VI), \alpha 2(VI), \alpha 3(VI)$
IX	Heterotrimer	$\alpha 1(IX) \alpha 2(IX) \alpha 3(IX)$
XI	Heterotrimer	$\alpha 1(XI) \alpha 2(XI) \alpha 3(XI)$
III	Homodimer	$[\alpha 1(III)]_3$
VII	Homodimer	$\alpha 1(VI), \alpha 2(VI), \alpha 3(VI)$
VIII	Homodimer	$[\alpha 1(VIII)]_3$
X	Homodimer	$[\alpha 3(X)]_3$

Tipe yang paling umum dijumpai adalah Tipe I, II, III, IV, dan V. Kolagen Tipe I umumnya menyusun kulit, tulang, tendon, ligamen, dan berbagai jenis organ, kemudian tipe II menyusun mata dan kartilago, dan tipe III menyusun kulit, otot, dan pembuluh darah. Kolagen Tipe IV berfungsi sebagai pembentuk lapisan epitel, terutama pada bagian membran basal, dan tipe V umumnya menyusun rambut, permukaan sel, dan plasenta. Kolagen sebagai penyusun matriks ekstraseluler (ECM) memiliki banyak peran biologis, antara lain untuk *cell survival*, proliferasi dan diferensiasi sel, dan menjaga integritas struktur sel (Sibilla dkk., 2005; Silvipriya dkk, 2015). Kolagen dalam perannya untuk menjaga integritas dan struktur sel berinteraksi dengan reseptor permukaan sel, umumnya integrin. Interaksi antara kolagen dan integrin dapat mempengaruhi ekspresi gen pada tingkat sel, sehingga ikut mempengaruhi pertumbuhan dan



diferensiasi sel. Interaksi tersebut dianggap berperan penting dalam *tumorigenicity and invasiveness* (Guszczyń & Sobolewski, 2004).

## 2.2 Sumber Kolagen

Sumber utama kolagen umumnya dapat diambil dari kulit mamalia seperti sapi (*bovine*) dan babi (*porcine*), dan yang sedang populer saat ini adalah sumber kolagen dari hewan laut (*marine collagen*). Kulit dan tulang merupakan jaringan yang sering diambil untuk ekstraksi kolagen dari sapi dan babi. Umumnya, untuk mendapatkan kolagen tipe I, bagian yang diambil adalah tendon, kolagen tipe IV didapatkan dari vili, dan kolagen tipe II dari kartilago rongga hidung atau sendi dari sapi. Meski dapat diambil dari mamalia, saat ini, kolagen lebih banyak diekstrak dari hewan-hewan laut (*marine collagen*), dengan beberapa alasan. Pertama, waktu ekstraksi yang dibutuhkan untuk mendapatkan kolagen dari hewan laut jauh lebih sedikit dibandingkan mamalia, namun hasil produksi yang didapat lebih banyak. Jika menggunakan sumber hewan mamalia, waktu ekstraksi yang dibutuhkan lebih lama, dan hasil ekstrak yang didapat hanya sekitar 12 g kolagen/1 kg bahan mentah. Ekstrak kolagen dari hewan laut juga memiliki respon inflamasi yang lebih rendah, bersifat non imunogenik, dan bebas zoonosis, seperti *bovine spongiform encephalopathy* (BSE), *foot and mouth disease* (FMD), dan *transmissible spongiform encephalopathy* (TSE) (Silvipriya dkk., 2015). Selain itu, alasan budaya dan agama juga menjadi salah satu kekurangan sumber kolagen mamalia. Sebagai contoh, agama Islam yang tidak diperkenankan mengonsumsi produk mengandung babi, serta agama Hindu yang melarang konsumsi produk dengan kandungan sapi (Huang dkk., 2016).

Istilah *marine collagen* digunakan untuk sumber kolagen yang berasal dari hewan perairan, termasuk juga hewan perairan tawar. *Marine collagen* dapat diperoleh dari beberapa sumber utama, yakni ikan, spons laut (*Chondrosia reniformis*, *Ircinia fusca*), ubur-ubur (*Aurelia aurita*, *Rhopilema asamushi*, *Stomolophus meleagris*, *Rhizostoma pulmo*), dan moluska laut seperti cumi-cumi (*Illex argentines*, *Dosidicus gigas*). Kolagen dari ikan (*fish collagen*) merupakan sumber *marine collagen* yang paling umum digunakan.

Hal ini disebabkan oleh ketersediaan dan kelimpahan yang lebih tinggi dan menghasilkan kolagen lebih banyak dibandingkan sumber hewan laut lainnya (Neves & Reis, 2016).

Tabel 2. Kolagen dari hewan laut

Jenis hewan laut	Nama ilmiah	Jaringan target
Ubur-ubur	<i>Chrysaora quinquecirrha</i> <i>Aurelia aurita</i> <i>Rhopilema esculentum</i>	Seluruh jaringan
Gurita Cuttlefish	<i>Octopus vulgaris</i> <i>Sepiella inermis</i> <i>Sepia pharaonis</i> <i>Sepia officinalis</i>	Kulit Kulit luar Kartilago kranial, kornea
Timun laut	<i>Hemicentrotus pulcherrimus</i> <i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	Organ embrionik
Bintang Laut	<i>Asterias amurensis</i> <i>Acanthaster planci</i>	
Kepiting	<i>Scylla serrate</i>	

### 2.3 Fish Collagen

*Fish collagen* atau kolagen dari ikan dapat diperoleh dari bagian kulit, tulang, kartilago, serta sisik. Kolagen Tipe I paling umum ditemukan pada ikan, khususnya pada kulit dan sisik dari beberapa spesies, seperti *Gadus morhua* dan *Hypophital michthysmolitrix*, dan tulang dari *Thunnus obesus*, *Pagrus major*, dan *Oreochromis niloticus*. Kolagen dari sisik ikan, selain memiliki keunggulan seperti *marine collagen* lainnya, juga memiliki satu kelebihan lain, yakni ramah lingkungan. Bagian sisik ikan menurut penelitian Zhang dkk.



(2007) mengandung kolagen dalam jumlah yang besar. Sisik yang digunakan sebagai sumber kolagen merupakan bagian yang umumnya tidak digunakan dalam pengolahan ikan untuk pangan (*waste product*), sehingga proses ekstraksi ini sekaligus mengurangi limbah sisik ikan (Neves & Reis, 2016; Silvipriya dkk., 2015). Salah satu jenis ikan yang digunakan sebagai sumber kolagen adalah ikan Gabus (*C. striata*) (Baehaki dkk., 2016). Ikan Gabus merupakan ikan yang hidup di air sungai, rawa, bahkan sedikit payau. Nilai ekonomis ikan Gabus terbilang tinggi, dengan jumlah hasil tangkapan yang melimpah. Total produksi ikan Gabus perairan umum tercatat meningkat  $\pm 27,67\%$  pada tahun 2007. Adapun jumlah total tangkapan ikan Gabus di perairan mengalami kenaikan dengan rata-rata sebesar  $2,75\%$  per tahun sehingga jumlah limbah produk yang dihasilkan pun mengalami peningkatan (Fuadi dkk., 2017).

Tabel 3. Komposisi asam amino pada kolagen sapi dan ikan (Tilapia)

Asam amino	Residu/1000	
	Sapi	Tilapia
Hidroksiprolin	87	85,3
Asam aspartinat	35	44,0
Threonin	17	25,2
Serin	35	35,6
Asam glutamate	70	72,3
Prolin	105	113,4
Glisin	296	333,3
Alanin	122	131,9
Valin	17	17,2

Kandungan yang terdapat dalam sisik ikan adalah protein, dan kristal garam kalsium ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ ). Protein penyusun sisik ikan terdiri atas kolagen (sebanyak 76% dari total protein pada sisik ikan) dan ichtylepidin (sebanyak 24 % dari total protein pada sisik ikan) (Masood dkk., 2015). Matriks kolagen pada sisik ikan memiliki struktur yang kaku akibat proses mineralisasi. Fase mineral terdiri dari *calcium hydroxyapatite*, dengan sejumlah ion natrium, magnesium,

karbonat dan fosfat (Setyowati & Setyani, 2015). Sisik ikan menurut Sujihtra dkk. (2013) mengandung 0,2- 10% kolagen dari total berat sisik, terutama kolagen tipe I. Salah satu karakter kolagen ikan adalah tingginya kelarutan pada asam dan kesamaan struktur rantai  $\alpha 1$  dan  $\alpha 2$  antar spesies, dibandingkan dengan kolagen dari aves dan mamalia. Komposisi asam amino kolagen ikan memiliki perbedaan dengan kolagen mamalia, seperti ditunjukkan pada Tabel 3 (Yamada dkk., 2014).

*Fish collagen* berdasarkan penelitian Baehaki dkk. (2016) memiliki aktivitas antioksidan. Jika dibandingkan dengan protein lain, kolagen memiliki karakter sebagai biomaterial yang sangat baik, antara lain antigenisitas dan toksisitas yang rendah, serta biodegradabilitas dan biokompatibilitas yang tinggi (Ramshaw dkk., 2009). Penelitian yang dilakukan oleh Jeevithan dkk. (2016) menunjukkan bahwa kolagen dari ikan, terutama kolagen tipe I, memiliki kemampuan untuk menginduksi terjadinya apoptosis sel limfosit T pada *cell line* leukemia (6T-CEM). Selain itu, kolagen sebagai salah satu penyusun matriks ekstraseluler sel juga mampu menginduksi apoptosis pada *cell line* epithelial Madin-Darby canine kidney (MDCK) (Ming dkk., 1998). Perkembangan penelitian mengenai kemampuan kolagen dalam aktivitas fisiologis tertentu yang dapat dimanfaatkan dalam bidang medis meningkatkan *target of interest* kolagen sisik ikan dalam berbagai penelitian.

## 2.4 Metode Ekstraksi Kolagen

Banyaknya manfaat dan potensi kolagen untuk bidang kesehatan berdampak pada perkembangan metode ekstraksi kolagen. Secara umum, terdapat dua metode ekstraksi kolagen, yakni ekstraksi menggunakan larutan asam dan ekstraksi secara enzimatis. Ekstraksi dengan larutan asam umumnya menggunakan asam asetat ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), asam laktat, asam sitrat, maupun asam kloroasetat untuk menghasilkan *acid-soluble collagen* (ASC) (Neves & Reis, 2016). Hasil ekstraksi ASC menurut Heu dkk. (2010) memiliki rendemen yang lebih rendah dibandingkan dengan ekstraksi secara enzimatis. Ekstraksi kolagen secara enzimatis umumnya menggunakan enzim protease seperti pepsin, menghasilkan *pepsin-soluble collagen* (PSC). Jenis enzim proteolitik lainnya yang juga

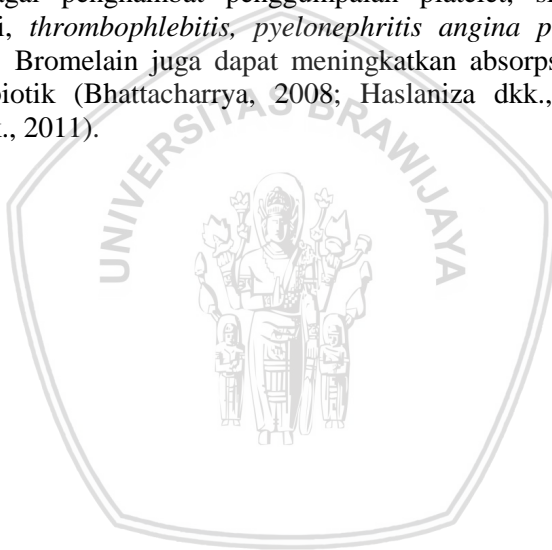
dapat digunakan dalam ekstraksi kolagen adalah tripsin, pancreatin, ficin, bromelain dan papain (Neves & Reis, 2016).

Ekstraksi kolagen, baik menggunakan asam maupun enzim, umumnya melalui tahap pretreatment. Tahap ini bertujuan untuk menghilangkan protein maupun molekul non-kolagen dari matriks kolagen bahan yang akan diekstraksi (Yoshimura dkk., 2000). Selanjutnya, tahap ekstraksi atau isolasi bertujuan untuk memutus ikatan *cross-link* ada kolagen, sehingga didapatkan peptida-peptida kolagen. Tahap inilah yang membedakan hasil dari kedua jenis ekstraksi. Larutan asam dapat memutus ikatan *cross-link* dengan baik, namun juga dapat merubah struktur kolagen. Enzim protease mampu memutus ikatan *cross-link* tanpa mengubah struktur kolagen, sehingga dianggap lebih efektif untuk digunakan dalam proses ekstraksi dan karakterisasi kolagen (Heu dkk., 2010).

## 2.5 Enzim Bromelain

Bromelain merupakan salah satu jenis enzim protease dari famili *sulphydryl proteolytic* yang memiliki kemampuan menghidrolisis ikatan peptida pada protein atau polipeptida. Bromelain dapat diperoleh dari tanaman nanas (Bromeliaceae) baik dari tangkai, kulit, daun, buah, maupun batang dalam jumlah yang berbeda. Meski demikian, sumber enzim bromelain yang umum digunakan adalah bagian batang dan daging buah, karena memiliki kandungan bromelain yang paling tinggi dibandingkan bagian lainnya (Wulandari dkk., 2010). Enzim bromelain yang didapatkan dari batang disebut bromelain (EC.3.4.22.32), sedangkan dari daging buah disebut bromelain (EC. 3.4.22.33). Fraksi proteinase yang paling aktif pada enzim bromelain adalah fraksi F9. Kerja enzim bromelain dapat dihambat oleh keberadaan  $Hg^{++}$ ,  $Ag^+$ ,  $Cu^{++}$ , antitripsin, estatin A dan B, dan iodoasetat. Enzim ini stabil pada pH 3-9,8 dan optimum untuk pemotongan protein pada pH 3-7 dan suhu 40-60 °C. Bromelain tersusun atas 212 asam amino, dengan berat molekul berkisar antara 23-37 KDa. Bromelain tersusun atas berbagai jenis proteinase dan bersifat non toksik, sehingga banyak digunakan dalam pengobatan. Penggunaan enzim bromelain antara lain pada industri pangan, medis, farmasi, dan kosmetik. (Bhattacharya, 2008; Mohan dkk., 2016; Pavan dkk., 2012).

Umumnya, dalam industri pangan, bromelain digunakan sebagai pengempuk daging, pelarut butir protein, penjernih bir, pengembang kue, dan produksi hidrolisat protein. Sifat hidrolitik yang dimiliki oleh bromelain juga dapat dimanfaatkan untuk menghidrolisis sisik dan tulang ikan. Penggunaan bromelain dalam proses tersebut lebih efisien, karena dibutuhkan energi hanya dalam jumlah rendah, tidak memerlukan *adjustment* pH, serta kontrol derajat dan durasi hidrolisis. Penggunaan bromelain dalam hidrolisis protein mampu menghasilkan total gugus  $\alpha$ -amino yang paling tinggi, jika dibandingkan dengan enzim protease lainnya, seperti alcalase, neutrase, dan papain. Manfaat bromelain dalam bidang medis diketahui sebagai penghambat penggumpalan platelet, sinusitis, trauma operasi, *thrombophlebitis*, *pyelonephritis angina pectoris*, dan bronchitis. Bromelain juga dapat meningkatkan absorpsi obat, terutama antibiotik (Bhattacharrya, 2008; Haslaniza dkk., 2010; Himonides dkk., 2011).



## BAB III METODE PENELITIAN

### 3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian dilakukan pada bulan Januari-Juni 2018 di Laboratorium Anatomi dan Fisiologi Hewan, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.

### 3.2 Ekstraksi Bromelain

Satu buah nanas dibersihkan, diambil bagian tengahnya (bonggol), kemudian diparut dan disaring. Filtrat sari nanas kemudian disentrifugasi 4000 rpm, 4 °C selama 5 menit. Supernatan diambil untuk perlakuan selanjutnya sebagai enzim bromelain (Mohan dkk., 2016).

### 3.3 Ekstraksi Kolagen Sisik Ikan

Isolasi protein kolagen dari sisik ikan dilakukan dengan dua metode pre-treatment. Kelompok perlakuan pertama diberi perlakuan perendaman NaOH 0,1 M (w/v 1:8) selama 3 hari (diganti setiap 24 jam sekali), dilanjutkan dengan dekalsifikasi menggunakan EDTA selama 24 jam. Seluruh proses pre-treatment untuk kelompok perlakuan ini dilakukan pada suhu 4 °C. Selanjutnya, untuk kelompok perlakuan kedua, perendaman dengan NaOH 0,1 M dilakukan selama 6 jam (diganti setiap 2 jam), sedangkan dekalsifikasi dilakukan selama 24 jam. Proses pre-treatment dilakukan pada suhu 4 °C (Neves & Reis, 2016).

Selanjutnya, sebanyak 1 g sisik ikan Gabus dimasukkan kedalam botol kultur, kemudian ditambahkan 10 mL bromelain. Botol ditutup dengan *plastic wrap*, kemudian diinkubasi pada suhu 55 °C selama ± 3 jam dalam *incubator shaker*. Sampel dimasukkan dalam *waterbath* suhu 80 °C selama 10 menit untuk menonaktifkan enzim bromelain. Sampel kemudian dipindahkan ke tabung propilen dan ditambahkan EtOH dingin untuk presipitasi. Sampel disentrifugasi pada 10000 rpm, suhu 4 °C selama 10 menit. Supernatan dibuang, pellet



dikeringinkan dan ditambahkan Tris-Cl pH 6,8 kemudian disimpan pada suhu -20 °C.

### 3.4 Pembuatan Kurva Standar Protein dan Uji Kuantitatif Protein

Kurva standar protein diperlukan untuk menentukan kadar protein dalam sampel. Pembuatan kurva standar dan uji kuantitatif protein dilakukan menggunakan reagen BIO-RAD Quick Start Bradford 1x Dye Reagent melalui *microplate assay*. Larutan stok BSA 2 mg/ml diencerkan dalam *diluent buffer* (buffer fosfat pH 7) menjadi berbagai konsentrasi (Tabel 1) sebagai larutan standar, kemudian dipindakan ke *microplate*. Selanjutnya ditambahkan Bio-Rad Quick Start Bradford 1x Dye Reagent ke dalam *microplate*, diinkubasi selama 15 menit, kemudian dibaca nilai absorbansinya pada panjang gelombang 630 nm menggunakan ELISA *reader*.

Tabel 4. Pembuatan Larutan Standar BSA

Tube	Volume standar( $\mu\text{L}$ )	Sumber standar	Volume diluen( $\mu\text{L}$ )	Kadar BSA ( $\mu\text{g/mL}$ )
1	30	2 mg/mL stok	10	1500
2	20	2 mg/mL stok	20	1000
3	20	Tube 1	20	750
4	20	Tube 2	20	500
5	20	Tube 4	20	250
6	20	Tube 5	20	125
7(blank)	-	-	20	0

### 3.5 Analisis SDS-PAGE

Analisis SDS-PAGE untuk protein kolagen dilakukan dengan modifikasi metode Liu dkk. (2010) menggunakan 8% *separating gel* dan 5 % *stacking gel* . Sebanyak 20  $\mu\text{l}$  sampel protein yang telah diisolasi dari sisik ikan Gabus ditambahkan dengan RSB (1:1),

kemudian dipanaskan pada suhu 100 °C selama 5 menit. Sampel disimpan pada suhu -20 °C. Selanjutnya, cetakan untuk pembuatan gel dirakit. Dibuat *separating gel* 8% terlebih dahulu (3,125 mL bis akrilamid, 2,75 mL 1M Tris pH 8,8, 1,505 mL akuabides, 75 µl SDS 10 %, 75 µl APS, dan 6,25 µl TEMED). Larutan *separating gel* dikocok perlahan, kemudian dituangkan ke cetakan yang sudah dirakit hingga batas, lalu tambahkan akuades dan didiamkan hingga gel memadat, akuades dibuang. Selanjutnya, dibuat *stacking gel* 5% (0,45 mL 30 % bis akrilamid, 0,38 mL 1M Tris pH 6,8, 2,11 ml akuabides, 20 µl SDS 10 %, 30 µl APS 10 %, dan 5 µl TEMED). Larutan dimasukkan ke dalam cetakan hingga penuh, ditunggu hingga memadat. Cetakan kemudian dimasukkan dalam *chamber* elektroforesis, lalu dituangkan *running* buffer untuk merendam gel. Dimasukkan 10 µl sampel ke dalam sumuran, kemudian dilakukan elektroforesis dengan tegangan 80 mA hingga *tracking dye* mencapai jarak 0,5 cm dari dasar gel. Gel diambil dari cetakan lalu diwarnai dengan 20 ml larutan pewarna (CB R250, 450 ml methanol, 450 ml akuades, 100 ml asam asetat glasial). Selanjutnya, gel dicuci dengan air dan direndam dalam larutan *destaining* (100 ml methanol, 100 ml asam asetat glasial).

### 3.6 Pembuatan Kurva Standar Berat Molekul Protein

Kurva standar berat molekul protein dibuat berdasarkan hasil SDS-PAGE. Jarak tiap band yang muncul marker (Bio-Rad Precision Plus Protein™ Dual Color Standards) dihitung, kemudian dimasukkan dalam persamaan (1). Selanjutnya dilakukan pembuatan kurva standar berat molekul untuk mendapatkan persamaan logaritmik, sehingga berat molekul kolagen dapat diketahui.

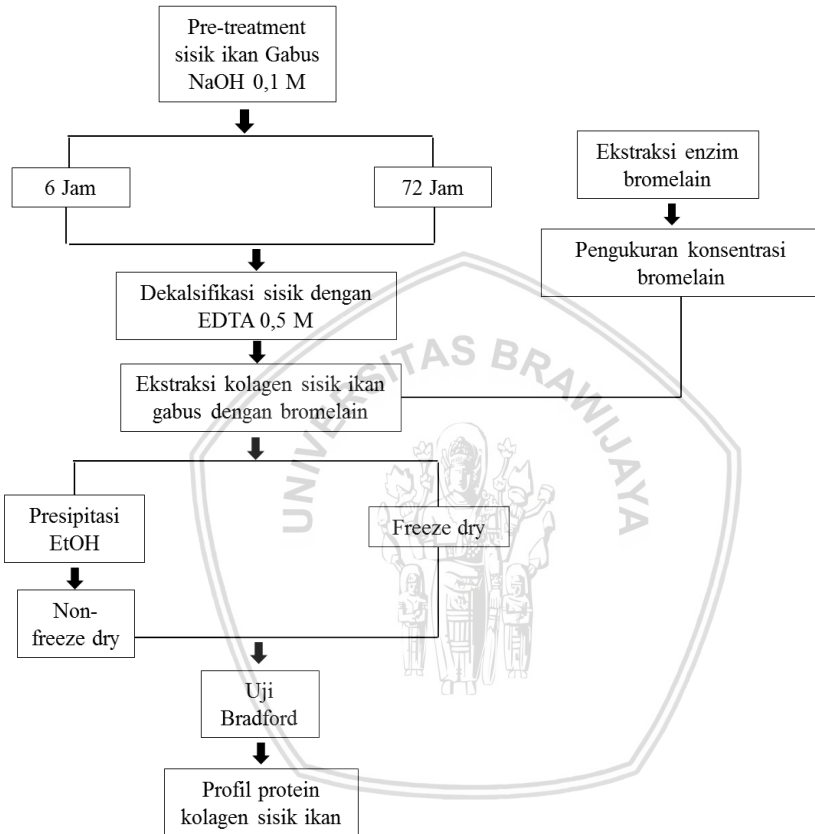
$$R_f = \frac{\text{jarak marker dari sumuran ke posisi migrasi}}{\text{jarak tracking dye dari tempat awal ke posisi migrasi}} \dots\dots\dots(1)$$

### 3.7 Analisis Data

Analisis statistik dilakukan dengan *software* SPSS 22.0 *for windows*. Data konsentrasi protein dianalisis menggunakan uji *Independent Sampel T-Test* dengan selang kepercayaan 95%. Kurva

standar protein BSA dan kurva standar berat molekul dianalisis menggunakan *software Ms. Excel*.

### 3.8 Kerangka Operasional Penelitian



Gambar 3. Skema kerangka operasional penelitian

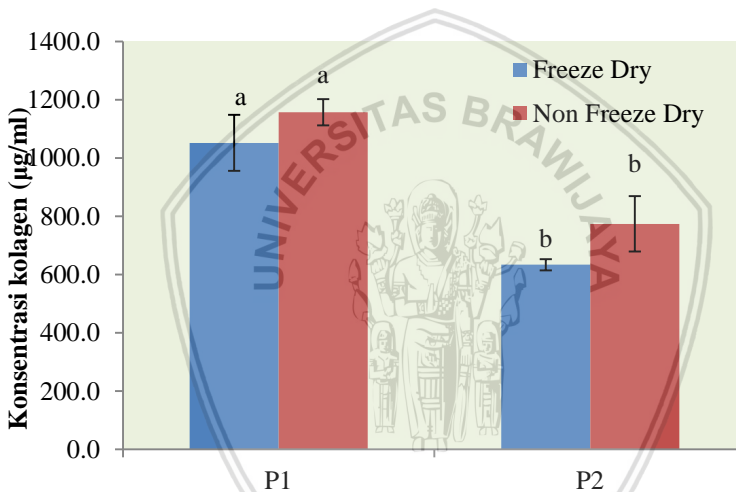
## BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Pengaruh Lama *Pretreatment* Alkali terhadap Konsentrasi Kolagen

Hasil pengukuran konsentrasi kolagen dengan metode Bradford dari dua jenis perlakuan *pretreatment* alkali dapat dilihat pada Gambar 4. Berdasarkan gambar tersebut, terlihat bahwa sampel ekstrak pada perlakuan 2 (P2) memiliki konsentrasi kolagen lebih rendah dibandingkan dengan perlakuan 1 (P1). Konsentrasi kolagen pada P1 adalah 1156,83  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  untuk sampel *non-freeze dry* dan 1224,9  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  untuk sampel *freeze dry*, sedangkan pada P2 konsentrasi kolagen didapatkan sebanyak 773,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  untuk sampel *non-freeze dry* dan 624,2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  untuk sampel *freeze dry*. Berdasarkan hasil uji *independence T-test* ( $p < 0,05$ ), terdapat perbedaan nyata antara kedua kelompok perlakuan. Enzim bromelain memiliki kemampuan mengekstrak protein dengan gugus asam amino paling tinggi jika dibandingkan dengan protease lain, seperti alcalase dan neutrase (Stein dkk., 2005). Konten asam amino protein hasil ekstraksi menggunakan bromelain dipengaruhi oleh konsentrasi bromelain, waktu dan suhu inkubasi (Hazlanisa dkk., 2010). Peningkatan konsentrasi bromelain menurut Ketnawa dkk. (2010) dapat mempengaruhi komponen hidrolisat kolagen dari kulit *giant catfish*, dimana konsentrasi bromelain sebesar 0,3 unit protein dapat menghilangkan komponen kolagen. Berdasarkan penelitian ini, konsentrasi protein hasil ekstraksi bromelain juga dipengaruhi oleh waktu dan suhu *pretreatment* alkali dengan NaOH.

Penggunaan NaOH 0,1 M pada *pretreatment* ekstraksi kolagen bertujuan untuk menghilangkan kandungan protein selain kolagenpigmen, serta untuk melindungi kolagen dari efek protease endogen selama proses ekstraksi (Neves, 2016). Larutan NaOH memecah sebagian besar daerah telopeptida dari molekul kolagen selama proses *pretreatment* (Yoshimura dkk., 2000), sehingga menimbulkan terjadinya *swelling* atau pembengkakan. Hal ini dipicu oleh reaksi sisik dengan NaOH, yang menyebabkan pereaksi melarutkan gugus OH yang berikatan dengan protein (Jaswir dkk., 2011). Kondisi tersebut memungkinkan terjadinya migrasi protein

non kolagen dan komponen non kolagen lainnya dari matriks kolagen akan mudah terlepas (Cho dkk., 2005). Selain itu, NaOH dapat menyebabkan *swelling* pada sisik ikan, sehingga meningkatkan laju transfer massa matriks jaringan pada proses ekstraksi dan membantu proses ekstraksi secara enzimatis maupun kimiawi (Liu dkk., 2015). Pembengkakan struktur sisik ikan ini penting karena mempengaruhi keutuhan struktur serat tropokolagen menjadi prokolagen melalui terganggunya ikatan non kovalen dan pada akhirnya memudahkan kelarutan kolagen pada proses ekstraksi (Wulandari dkk., 2015).



Gambar 4. Pengaruh waktu *pretreatment* NaOH terhadap konsentrasi kolagen hasil ekstraksi sisik ikan Gabus (*C. striata*) menggunakan enzim bromnelain

Kemampuan NaOH dalam mendegradasi protein non-kolagen dipengaruhi oleh konsentrasinya. Perendaman sisik ikan pada NaOH 0,05-0,1 M efektif untuk menghilangkan protein non-kolagen pada sisik ikan tanpa mengalami perubahan struktur, sedangkan konsentrasi yang lebih pekat (0,2-0,5M) dapat mempengaruhi struktur kolagen (Schidmt, 2016). Lama perendaman dengan NaOH juga dapat mempengaruhi konsentrasi kolagen yang dihasilkan dari proses

ekstraksi enzimatis. Durasi *pretreatment* alkali menggunakan NaOH menurut Prestes (2013) dapat dikondisikan dari beberapa hari hingga beberapa minggu. Hal ini juga berbanding lurus dengan faktor suhu, dimana konten hidroksiprolin dapat menurun secara signifikan pada suhu  $> 20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Liu dkk., 2015). Lama waktu *pretreatment* alkali yang efektif menurut penelitian Wulandari dkk. (2015) dapat berbeda-beda antara sumber kolagen yang diekstrak. Kulit ikan membutuhkan waktu *pretreatment* NaOH 6-10 jam (Wulandari dkk., 2015), sedangkan untuk sisik dan tulang ikan, lama *pretreatment* alkali bergantung pada spesies ikan yang menjadi sumbernya (Liu dkk., 2015).

Tabel 5. Pengaruh proses freeze-dry terhadap konsentrasi kolagen hasil ekstraksi sisik ikan Gabus (*C. striata*)

Sampel	Konsentrasi protein ( $\mu\text{g/ml}$ )	
	FD	NFD
P1	*1051,75 $\pm$ 45 <sup>a</sup>	*1156,83 $\pm$ 96 <sup>a</sup>
P2	*633,31 $\pm$ 95 <sup>b</sup>	*773,53 $\pm$ 19 <sup>b</sup>

Keterangan: \* Rata-rata  $\pm$  Standar Deviasi

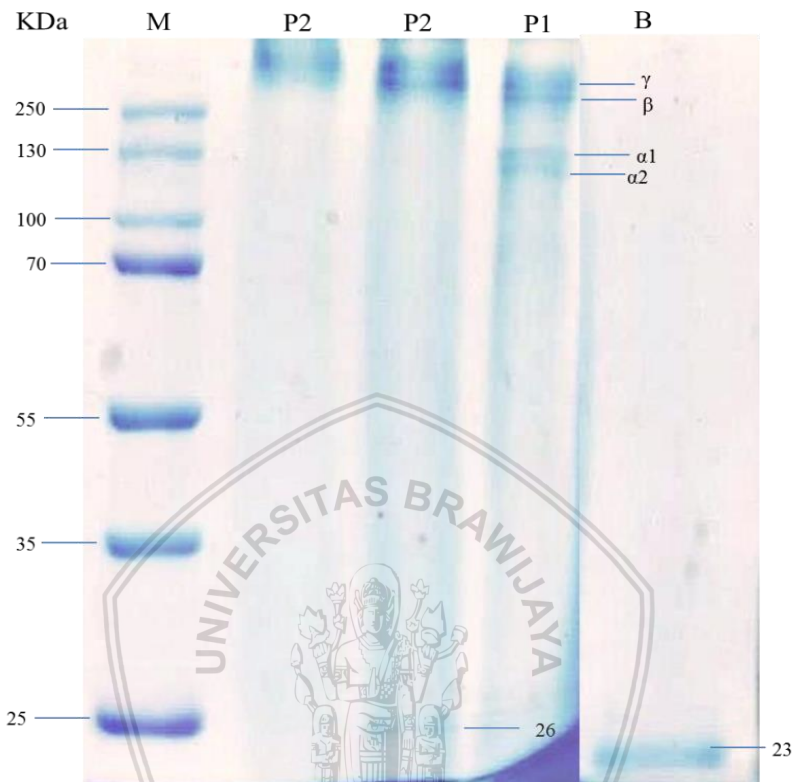
Hasil uji Bradford pada Tabel 5 menunjukkan bahwa konsentrasi kolagen pada sampel *freeze dry* dan sampel *non-freeze dry* tidak memiliki perbedaan nyata, baik pada sampel P1 maupun P2. Rerata konsentrasi sampel *freeze dry* pada P1 adalah 1051  $\mu\text{g/ml}$ , sedangkan pada sampel *non-freeze dry* adalah 1156  $\mu\text{g/ml}$ . Proses *freeze dry* atau dikenal juga dengan istilah liofilisasi merupakan proses kering beku yang dapat mengurangi kadar air pada sampel. Tahapan *freeze dry* meliputi tahap beku (*solid*), kemudian dikeringkan dalam kondisi *vacuum* agar kandungan air dalam sampel berkurang (Carpentier dkk., 2007; Ciurzynska & Lenart, 2011). Proses *freeze dry* dalam ekstraksi kolagen menurut Nagai dkk. (2005) berfungsi untuk memperpanjang *life span* dari peptida hasil ekstraksi. Tidak adanya perbedaan nyata dari kedua jenis sampel, *freeze dry* dan *non freeze dry*, menunjukkan bahwa kedua sampel dapat digunakan untuk analisis lebih lanjut. Proses pengeringan merupakan tahapan yang

penting, karena dapat menghambat degradasi enzimatis protein dan membatasi pertumbuhan mikroba pada sampel. Hal ini meminimalisir kemungkinan kerusakan maupun kontaminasi sampel, sehingga protein kolagen memiliki *life-span* yang lebih panjang (Zeng dkk., 2013).

#### 4.2 Profil protein kolagen hasil ekstraksi sisik ikan Gabus dengan enzim bromelain

Hasil analisis SDS-PAGE pada Gambar 5 menunjukkan bahwa dari ekstraksi sisik ikan Gabus diperoleh berat molekul kolagen antara 26-332 KDa. Dari sampel P2.1 diperoleh berat molekul kolagen sebesar 332,74 KDa, dari sampel P2.2 sebesar 26,53 KDa dan 268,29 KDa, dari sampel P1 diperoleh empat band protein dengan berat molekul 125,39 KDa-332,74 KDa, dan kontrol enzim bromelain 23,28 KDa. Sotelo dkk (2016) menyebutkan bahwa kisaran berat molekul kolagen dari ikan adalah 100-200 KDa, dan merupakan kolagen tipe I (Pati dkk., 2016). Kolagen tipe I terdiri atas dua rantai  $\alpha$  dengan berat molekul 120-150 KDa (Pati dkk., 2010) dan subunit  $\beta \pm 200$  KDa (Sotelo dkk., 2016).

Hasil separasi protein pada Gambar 4 menunjukkan bahwa pada sampel ekstrak P1, terbentuk 4 band yang diduga sebagai rantai  $\alpha 1$  (125,39 KDa),  $\alpha 2$  (152 KDa),  $\beta$  (268 KDa), dan  $\gamma$  (332 KDa) sedangkan pada sampel P2 tidak dideteksi adanya komponen rantai  $\alpha$ . Sampel P2.2 menunjukkan adanya band peptida dengan berat molekul 26 KDa. Menurut Huang dkk. (2016) kondisi tersebut menunjukkan bahwa ada peptida lain dari degradasi kolagen yang memiliki fungsi sebagai pengkelat mineral. Selain itu, menurut Mahboob (2015), adanya band dengan berat molekul rendah pada hasil ekstraksi kolagen sisik dan kulit ikan dapat berupa peptida lain seperti elastin. Berdasarkan hasil perbandingan dengan literatur, dapat disampaikan bahwa kolagen yang diekstraksi dari sisik ikan Gabus (*C. striata*) merupakan kolagen tipe I. Hal ini sesuai dengan penelitian Nagai dkk. (2004), Huang dkk. (2016) dan Sujihtra dkk. (2015), dimana hasil SDS-PAGE hidrolisat kolagen sisik ikan secara enzimatis menunjukkan pola band kolagen tipe I, dengan dua rantai  $\alpha 1$  dan rantai  $\alpha 2$ , serta subunit  $\beta$  dan  $\gamma$  (Gambar 6).

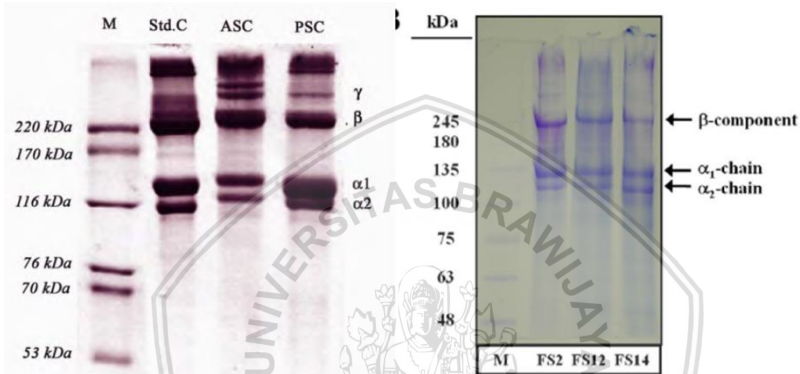


Gambar 5. Visualisasi SDS-PAGE protein kolagen sisik ikan Gabus (*Channa striata*) hasil ekstraksi menggunakan enzim bromelain. Sampel P2 (perlakuan 2) menunjukkan pola band protein dengan BM yang tinggi (268-332,74 KDa), sedangkan sampel P1 (perlakuan 1) menunjukkan pola band protein antara 125-332 KDa, sedangkan sampel kontrol enzim bromelain (B) memiliki BM 23 KDa

Perbedaan pola band peptida yang terbentuk dari hasil ekstraksi perlakuan 1 dan 2 diduga akibat perbedaan *pretreatment* alkali, sehingga mempengaruhi efektivitas hidrolisis oleh enzim bromelain. Kemampuan hidrolisis enzim bromelain dipengaruhi oleh pH, dimana kondisi pH optimum bagi bromelain adalah 5,5-8. *Pretreatment* alkali pada perlakuan 1 dilakukan selama 72 jam,



sehingga proses ini diduga mempengaruhi pH bahan dasar ekstraksi, yakni sisik ikan Gabus. NaOH merupakan senyawa bersifat basa dengan pH 13,5. Perubahan pH sisik ikan menjadi basa dapat mengakibatkan proses hidrolisis oleh bromelain tidak dapat terjadi secara optimum, sehingga pada perlakuan 1, kolagen pada hasil karakterisasi SDS-PAGE masih terdeteksi subunit  $\beta$  dan  $\gamma$  (Gambar 4).

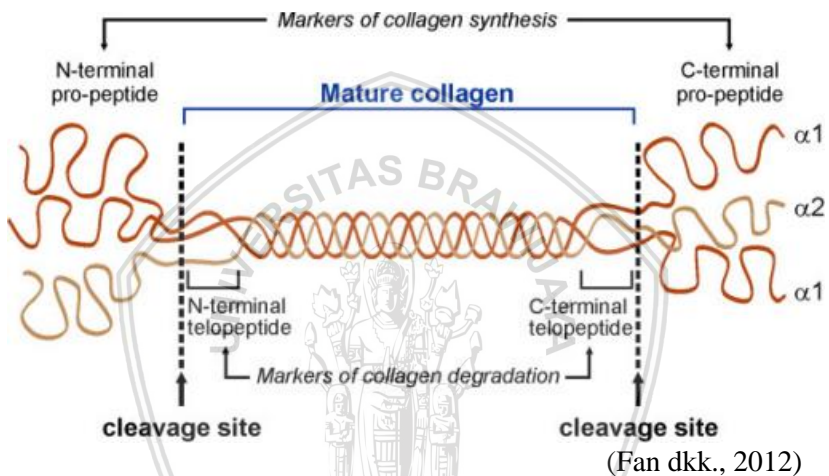


(Sujihtra dkk., 2015; Huang dkk., 2016)

Gambar 6. Profil protein kolagen sisik ikan hasil ekstraksi enzimatis

Pemanasan kolagen pada suhu  $\geq 40^{\circ}\text{C}$  pada proses ekstraksi enzimatis dapat memecah ikatan hidrogen dan elektrostatik yang menstabilkan struktur heliks dari kolagen. Selanjutnya, ekstraksi secara enzimatis akan menyebabkan reaksi hidrolisis untuk memutus ikatan intramolekul antara ketiga rantai heliks kolagen. Apabila ikatan intramolekul tersebut masih tersisa atau tidak mengalami hidrolisis, dapat terbentuk struktur gelatin berupa subunit  $\beta$  dan  $\gamma$  (Shimpi, 2017). Subunit  $\beta$  merupakan bentuk dimer kolagen (*intramolecular cross-linking*) yang terdiri atas komposisi rantai  $\alpha1\alpha2$  atau dua rantai  $\alpha1$  yang dihubungkan oleh satu atau lebih ikatan kovalen, sedangkan subunit  $\gamma$  (*intermolecular cross-linking*) dari kolagen tipe I yang muncul pada bagian atas gel SDS-PAGE merupakan bentuk trimer kolagen yang terdiri dari tiga rantai  $\alpha$  dan dihubungkan oleh ikatan kovalen (Poteross dkk., 2009; Yamada dkk., 2013). Adanya

komponen subunit  $\beta$  dan  $\gamma$  pada sampel P1 menunjukkan bahwa masih terdapat ikatan *cross-link* pada kolagen. Enzim bromelain bekerja pada titik pemotongan (*cleavage site*) pada gugus karbonil dari lisin, alanine, tirosin dan glisin (Wani & Mashru, 2014). Glisin merupakan asam amino yang dominan pada kolagen, dengan motif asam amino repetitif yang selalu sama, yakni Glisin-X-Y (Pati dkk., 2010).



Gambar 7. Titik pemotongan (*cleavage site*) enzim bromelain pada protein kolagen

Bromelain pada kolagen bekerja pada ujung N dan C dari daerah non-*helical* (telopeptida) (Gambar 6). Penelitian Ogawa dkk. (2003) menunjukkan bahwa pada metode ekstraksi kolagen menggunakan enzim hidrolase, ikatan *cross-linking* yang mengandung telopeptida pada kolagen akan dihidrolisis, sehingga rantai  $\beta$  (trimer) akan berubah menjadi monomernya ( $\alpha 1$  dan  $\alpha 2$ ). Apabila enzim tidak berada pada kondisi optimumnya, kerja enzim dalam menghidrolisis ikatan disulfida pada daerah telopeptida menjadi tidak optimum, sehingga kolagen tidak dapat terurai menjadi komponen monomernya, yakni rantai  $\alpha$ . Hasil SDS-PAGE pada Gambar 5 juga

menunjukkan adanya *smear* pada setiap *lane*. Munculnya pola *smear* pada hasil SDS-PAGE menurut Xiong (2008) sering terjadi pada sampel kolagen dengan berat molekul yang tinggi (*high molecular weight*), mengindikasikan tingginya aktivitas *cleavage* enzimatis pada kolagen. Hal ini juga dapat mengindikasikan adanya degradasi sejumlah protein dalam sampel. Degradasi ini dapat dikaitkan dengan aktivitas hidrolisis oleh bromelain, ditandai dengan tidak adanya residu sisik ikan pada akhir proses ekstraksi. Larutnya sisik selama proses ekstraksi enzimatis dengan bromelain menunjukkan adanya aktivitas hidrolisis yang tinggi, meski demikian, profil protein kolagen pada sampel P2 tidak menunjukkan keberadaan rantai  $\alpha$ .



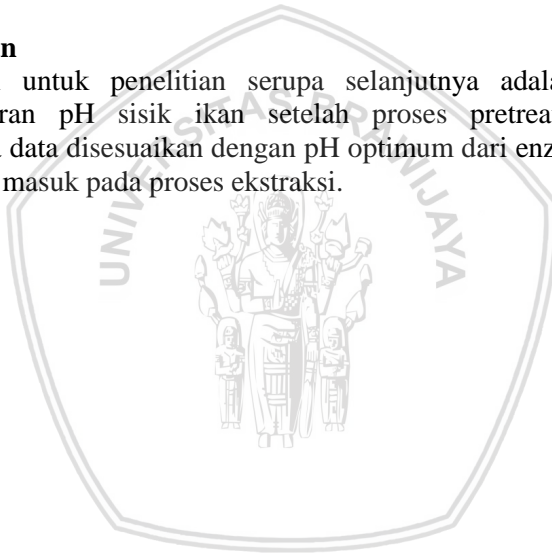
## BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah lama waktu proses pretreatment alkali dalam ekstraksi kolagen dengan enzim bromelain dapat mempengaruhi konsentrasi kolagen yang didapat. Semakin lama pretreatment alkali, semakin sedikit konsentrasi kolagen yang didapat. Kolagen yang didapatkan dari hasil ekstraksi sisik ikan Gabus (*C. striata*) menggunakan enzim bromelain adalah kolagen tipe 1 yang terdiri dari rantai  $\alpha 1$  (125 KDa) dan  $\alpha 2$  (152 KDa).

### 5.2 Saran

Saran untuk penelitian serupa selanjutnya adalah dilakukan pengukuran pH sisik ikan setelah proses pretreatment alkali, sehingga data disesuaikan dengan pH optimum dari enzim bromelain sebelum masuk pada proses ekstraksi.



## DAFTAR PUSTAKA

- Baehaki, A., S.D. Lestari & I. Desliani. 2016. Collagen hydrolysis from skin and bone of *Pangasius catfish* prepared by bromelain enzyme and antioxidant activity of hydrolysate. *Der Pharma Chemica*. 8(4): 155-158.
- Berilis, P. 2015. Marine Collagen: Extraction and Applications. *Research Trends in Biochemistry, Molecular Biology and Microbiology*. 1-15.
- Bhattacharyya, B.K. 2008. Bromelain: An overview. *Natural Product Radiance*. 7(4): 359-363.
- Canelon, S.P. & J.M. Wallace. 2016.  $\beta$ -aminopropionitrile-induced reduction in enzymatic crosslinking causes *in vitro* changes in collagen morphology and molecular composition. *PLoS ONE*. 11(11): 1-13.
- Carpentier, S.C., K. Dens, I.V. Den Houwe, R. Swennen & B. Panis. 2007. Lyophilization, a Practical Way to Store and Transport Tissues Prior to Protein Extraction for 2DE Analysis. *Practical Proteomics*. 1(2007): 64-69.
- Cho, S.M., Y.S. Gu & S.B. Kim. 2005. Extracting optimization and physical properties of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) skin gelatin compared to mammalian gelatins. *Food Hydrocolloids*. 19:221– 229.
- Ciurzynska, A. & A. Lenart. 2011. Freeze-drying application in food processing and biotechnology. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 61(3):165-171.
- Fan, D., A. Takawale, J. Lee & Z. Kassiri. 2012. Cardiac fibroblasts, fibrosis and extracellular matrix remodelling in heart disease. *Fibrogenesis and Tissue Repair*. 5 (15): 1-13.
- Fuadi, M., H. Santoso & A. Syauqi. 2017. Uji kandungan albumin ikan Gabus (*Channa striata*) dalam perbedaan lingkungan air. *Biosaintropis*. 3(1): 23-30.
- Gelse, K., E. Poschl & T. Aigner. 2003. Collagens-structure, function and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 55: 1531-1546.

- Guszczyn, T. & K. Sobolewski. 2004. Deregulation of collagen metabolism in human stomach cancer. *Pathobiology*. 2004(71): 308-313.
- Haslaniza, H., M.Y. Maskat, W.M. Wan Aida & S. Mamot. 2010. The effects of enzyme concentration, temperature and incubation time of nitrogen content and degree of hydrolysis of protein precipitate from cockle (*Anadara granosa*) meat wash washer. *Intl. Food Research Journal*. 17:147-152.
- Herdyausti, N. 2006. Isolasi dan karakterisasi ekstrak kasar enzim bromelain dari batang nanas (*Ananas comusus* L.merr). *Berk. Penel. Hayati*. 12:(75-77).
- Heu, M.S., J.H. Lee, H.J. Kim, S.J. Jee, J.S. Lee, Y.J. Jeon, F. Shahidi & J.S. Kim. 2010. Characterization of Acid- and Pepsin-soluble Collagen from Flatfish Skin. *Food Sci. Biotechnol*. 19(1): 27-33.
- Himonides, A.T., A.K.D. Taylor, & A.J. Morris. 2011. A study of the enzymatic hydrolysis of fish frames using model systems. *Food and Nutrition Sciences*. 2011(2):575-585.
- Huang, C.Y., J.M. Kui, S.J. Wu & H.T. Tsai. 2016. Isolation and characterization of fish scale collagen from tilapia (*Oreochromis* sp.) by a novel extrusion-hydroextraction process. *Food Chemistry*: 190(2016), 997-1006.
- Jaswir, I., H.A. Monsur & H.M. Saleh. 2011. Nano-structural analysis of fish collagen extracts for new process development. *African Journal of Biotechnology*. 10(81): 18847-18854.
- Jeevithan, E., Z. Jingyi, B. Bao, W. Shujun, R. Jeyashakila, & W.H. Wu. 2016. Biocompatibility assessment of type-II collagen and its polypeptida for tissue engineering: effect of collagen's molecular weight and glycoprotein content on tumor necrosis factor (Fas/Apo-1) receptor activation in human acute T-lymphocyte leukemia cell line. *Royal Society of Chemistry Advance*. 6: 14236-14246.
- Ketnawa, S., S. Rawdkuen & P. Chaiwut. 2010. Two phase partitioning and collagen hydrolysis of bromelain from pineapple peel *Nang-Lae* cultivar. *Biochemical Engineering Journal*. 52(2010): 205-211.

- Liu, Z., A.C.M. Oliveira & Y.C. Su. 2010. Purification and Characterization of Pepsin-Solubilized Collagen from Skin and Connective Tissue of Giant Red Sea Cucumber (*Parastichopus californicus*). *J. Agric. Food Chem.* 2010(58): 1270-1274.
- Mahbooh, S. 2015. Isolation and characterization of collagen from fish waste material- skin, scales and fins of *Catla catla* and *Cirrhinus mrigala*. *J. Food Sci. Technol.* 52(7): 4296-4305.
- Mann, D.L., D.P. Zipes, P. Libby, dan R.O. Bonnow. 2015. **Braunwald's Heart Disease.** Elsevier Saunders. Philadelphia.
- Masood, Z., R. Yasmeen, M.S. Haider, O.M. Tarar, L. Zehra & M.Y. Hossain. 2015. Evaluation of crude protein and amino acid contents from the scales of four mullet species (Mugilidae) collected from Karachi fish harbor, Pakistan. *Indian Journal of Geo-Marine Science.* 44(5): 724-731.
- Ming, J.T., J.H. Jeng, H.H. Lin, W.T. Chiu, & S.T. Jiang. 1998. Collagen gel overlay induces apoptosis of polarized cells in cultures: disoriented cell death. *The American Physiological Society.* 921-931.
- Mohan, R., V. Sivakumar, T. Rangasamy & C. Muralidharan. 2016. Optimisation of bromelain enzyme extraction from pineapple (*Ananas comosus*) and application in process industri. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology.* 12(3): 188-195.
- Nagai, T., M. Izumi & M. Ishii. 2004. Fish scale collagen: reparation and partial characterization. *International Journal of Food Science and Technology.* 2004(39): 239-244.
- Najman, S. 2016. **Cell Biology: New Insights.** Intech Publisher. London.
- Neves, N.M. & R.L. Reis. 2016. **Biomaterials from Nature for Advanced Devices and Therapies.** John Wiley & Sons. New York.
- Nuranna, L., M.F. Aziz, S. Cornain, G. Purwoto, S. Purbadi, S. Budiningsih, B. Siregar & A.A.W. Peters. 2012. Cervical cancer prevention program in Jakarta, Indonesia: see and treat model in developing country. *J. Gynecol. Oncol.* 23(3): 147-152.

- Ogawa, M., Moody, M.M., Portier, R.J., Bell, J., Schexnayder, M.A., Losso, J.N., 2003. Biochemical properties of black drum and sheepshead seabream skin collagen. *J. Agric. Food Chem.* 5 (27): 8088-8092.
- Pati, F., B. Adhikari & S. Dhara. 2010. Isolation and characterization of fish scale collagen of higher thermal stability. *Bioresource Technology.* 101(2010): 3737-3742.
- Pavan, R., S. Jain, Shraddha & A. Kumar. 2012. Roperties and Therapeutic Application of Bromelain: A Review. *Biotechnology Research International.* 2012: 1-6.
- Poteross, T., N. Raksakulthai, J. Runglerdkreangkrai & W. Worawattanamateekul. 2009. Characteristics of collagen from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin isolated by two different methods. *Natural Sciences.* 43(3): 584-593.
- Ramshaw, J.A.M., Y.Y. Peng, V. Glattauer & J.A. Werkmeister. 2009. Collagen as biomaterials. *J. Mat. Res. Mat. Med.* 20: 3-8.
- Schmidt, M.M., R.C.P. Dornelles, R.O. Mello, E.H. Kubota, M. A. Mazutti, A.P. Kempka & I.M. Demiate. 2015. Collagen extraction process. *International Food Research Journal.* 23(3): 913-922.
- Setyowati, H. & W. Setyani. 2015. Potensi Nanokolagen Limbah Sisik Ikan sebagai *Cosmeceutical*. *Jurnal Farmasi Sains dan Komunitas.* 12(1): 30-40.
- Shimpi, N.G. 2017. **Biodegradable and Biocompatible Polymer Composites: Processing, Properties and Applications.** Woodhead Publishing. Cambridge.
- Sibilla, S., M. Godfrey, S. Brewer, A.B. Raja, & L. Genovese. 2015. An overview of the beneficial effects of hydrolysed collagen as a nutraceutical on skin properties: scientific background and clinical studies. *The Open Nutraceuticals Journal.* 2015(8): 29-42.
- Silvipriya, K.S., K.K. Kumar, A.R. Bhat, B.D. Kumar, A. John, P. Iakshmanan. 2015. Collagen: Animal sources and biomedical application. *Journal of Applied Pharmaceutical Science.* 5(3): 123-127.
- Sotelo, C.G., M.C. Comesana, .R. Ariza & R.I.P. Martin. 2016. Characterization of collagen from different discarded fish



- species of the west coast of the Iberian Peninsula. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. 25(3): 388-399.
- Stein I. A., J. H. Svein & G. H. E. Vincent. 2005. Enzymatic hydrolysis of atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera. *Process Biochemistry*. 40: 1957–1966.
- Sujihtra, S., N. Kiruthiga, M.J. Prabhu & R. Kumeresan. 2013. Isolation and Determination of Type I collagen from tilapia (*Oreochromis niloticus*) waste. *International Journal of Engineering and Technology*. 5(3): 2181-2185.
- Wani, S.S. & R.C. Mashru. 2014. Sensitive and selective methods for determination of proteolytic activity of formulation containing bromelain and trypsin as proteolytic enzymes. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 5(11): 4838-4845.
- Wulandari, P. Suptijah & K. Tarman. 2015. Efektivitas pretreatment alkali dan hidrolisis asam asetat terhadap karakteristik kolagen dari kulit ikan Gabus. *JPHPI*. 18(3): 287-302.
- Yamada, S., H. Nagaoka, M. Terajima, N. Tsuda, Y. Hayashi & M. Yamauchi. 2013. Effects of fish collagen peptides on collagen post-translational modifications and mineralization in an osteoblastic cell culture system. *Dent Mater. J*. 32(2): 88-95.
- Yamada, S., K. Yamamoto, T. Ikeda, K. Yanagiguchi, dan Y. Hayashi. 2014. Potency of fish collagen as a scaffold for regenerative medicine. *BioMed Research International*. 2014:1-3.
- Yoshimura K, Terashima M, Hozan D, Shirai K (2000). Preparation and dynamic viscoelasticity characterization of alkali-solubilized collagen from shark skin. *J. Agric Food Chem*. 48(3): 685-690.
- Zeng, Q.R., M. Zhang, B.P. Andhikari & A.S. Mujumdar. 2013. Effect of drying processes on the functional properties of collagen peptides produced from chicken skin. *Drying Technology*. 31: 1653-1660.
- Zhang, Y., W. Liu, G. Li, Y. Miao & X. Wu. 2007. Isolation and partial characterization of pepsin soluble collagen from the skin of grass carp (*Centropharyngodon idella*). *J. Food Chem*. 103:906-912.