

**PENGARUH JENIS ASAM DAN LAMA PERENDAMAN
YANG BERBEDA TERHADAP SIFAT FISIKOKIMIA HASIL EKSTRAKSI
KOLAGEN SISIK IKAN KAKAP MERAH (*Lutjanus sp.*)**

**SKRIPSI
PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERIKANAN**

**Oleh :
YANUAR SONNY LEKSONO
0510830078**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

MALANG

2010

**PENGARUH JENIS ASAM DAN LAMA PERENDAMAN
YANG BERBEDA TERHADAP SIFAT FISIKOKIMIA HASIL EKSTRAKSI
KOLAGEN SISIK IKAN KAKAP MERAH (*Lutjanus sp.*)**

**SKRIPSI
PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERIKANAN**

Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Meraih Gelar Sarjana

**Oleh :
YANUAR SONNY LEKSONO
0510830078**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2010**

**PENGARUH JENIS ASAM DAN LAMA PERENDAMAN
YANG BERBEDA TERHADAP SIFAT FISIKOKIMIA HASIL EKSTRAKSI
KOLAGEN SISIK IKAN KAKAP MERAH (*Lutjanus sp.*)**

**SKRIPSI
TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN**

Oleh:
YANUAR SONNY LEKSONO
NIM. 0510830078

telah dipertahankan didepan penguji
pada tanggal 15 Januari 2010 dan
dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui

Dosen Penguji I

Ir. Yahya, MP
NIP. 196307061990031003
Tanggal: _____

Dosen Penguji II

Ir. Anies Chamidah, MP
NIP. 196409121990022001
Tanggal: _____

Dosen Pembimbing I

Dr. Ir. Happy Nursyam, MS
NIP. 196003221986011001
Tanggal: _____

Dosen Pembimbing II

Ir. Dwi Setijawati, M.Kes
NIP. 196110221988022001
Tanggal: _____

**Mengetahui,
Ketua Jurusan**

Dr. Ir. Happy Nursyam, MS
NIP. 196003221986011001
Tanggal: _____

RINGKASAN

YANUAR SONNY LEKSONO. Pengaruh Jenis Asam Dan Lama Perendaman Yang Berbeda Terhadap Sifat Fisikokimia Hasil Ekstraksi Kolagen Sisik Ikan Kakap Merah (*Lutjanus sp.*). (Dibawah bimbingan **Dr. Ir. Happy Nursyam, MS** dan **Ir. Dwi Setijawati, M.Kes**)

Kolagen merupakan bagian protein yang melimpah dalam tubuh mamalia termasuk manusia, terdapat sekitar 25% dari total protein. Kolagen yang belum terdenaturasi dari sumber tersebut dapat diaplikasikan pada kosmetik, biomedik, serta industri farmasi. Pada umumnya, kolagen diisolasi dari kulit hewan ternak, seperti sapi dan babi. Pada beberapa tahun terakhir ini, adanya *bovine spongiform encephalopathy (BSE)* dan *the foot-and-mouth disease (FMD)* telah menyebabkan pelarangan ekspor impor kolagen, sehingga membutuhkan alternatif sumber kolagen yang aman. Sisik ikan dapat dimanfaatkan sebagai sumber alternatif pembuatan kolagen karena banyak senyawa kimia yang terkandung dalam sisik ikan, antara lain adalah 41-84% merupakan protein organik (kolagen dan ichtylepidin) dan sisanya merupakan residu mineral dan garam inorganik seperti magnesium karbonat dan kalsium karbonat.

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH), Universitas Brawijaya Malang, pada bulan Agustus - November 2009. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen. Rancangan penelitian dengan Rancangan Acak Lengkap Faktorial. Perlakuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui jenis pelarut asam dan lama ekstraksi yang terbaik dalam mendapatkan kolagen dari sisik ikan. Metode analisa data untuk data parametrik yaitu dengan Analisis Sidik Ragam (ANOVA) yang dilanjutkan dengan uji Beda Nyata jujur (BNJ). Untuk perlakuan terbaik diperoleh dengan metode De Garmo. Parameter yang diamati adalah: yield, titik leleh, kadar air, suhu denaturasi, dan SDS-PAGE.

Perlakuan dengan jenis pelarut dan lama ekstraksi yang berbeda memberikan pengaruh yang berbeda nyata terhadap yield, titik leleh, dan kadar air dan pola pergerakan pita SDS-PAGE. Sedangkan lama ekstraksi yang berbeda tidak memberikan pengaruh yang nyata terhadap suhu denaturasi. Hasil perhitungan perlakuan terbaik menggunakan metode De Garmo menunjukkan bahwa jenis pelarut asam asetat selama 5 hari merupakan perlakuan terbaik. Perlakuan tersebut mempunyai yield sebesar $24.37 \pm 0.451 \%$, kadar air $82.45 \pm 0.17 \%$, titik leleh $43.5 \pm 0.58 \text{ }^\circ\text{C}$, dan suhu denaturasi $32.0 \pm 3.266 \text{ }^\circ\text{C}$, dan memiliki asam amino penyusun dengan berat molekul 74,96 – 169,48 KDa.

Pada ekstraksi kolagen sisik ikan kakap merah yang telah dilakukan, maka disarankan perlu adanya perlakuan penghancuran sisik ikan dan modifikasi proses ekstraksi secara enzimatik untuk menghasilkan yield yang lebih besar. Serta karakterisasi kualitas kolagen sisik ikan kakap merah menggunakan foto *Scanning Electron Microscopy (SEM)* dan uji *Fourier Transform Infra-Red (FTIR)*

KATA PENGANTAR

Dengan menyebut nama **Allah SWT** Yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang. Segala puji hanya milik **Allah SWT** yang telah memberikan kemampuan kepada umat manusia untuk senantiasa berpikir. Shalawat dan salam semoga tetap terlimpahkan kepada **Nabi Muhammad Saw** yang telah memberikan tuntunan gaya hidup terbaik bagi insan yang beriman. Shalawat dan salam juga semoga terlimpahkan ke atas keluarga beliau, sahabat beliau dan umat manusia yang senantiasa mengikuti jejak **Rasulullah Saw**.

Suatu kebanggaan bagi penulis yang telah menyelesaikan Laporan penelitian dengan judul "*Pengaruh Jenis Asam Dan Lama Perendaman Yang Berbeda Terhadap Sifat Fisikokimia Hasil Ekstraksi Kolagen Sisik Ikan Kakap Merah (*Lutjanus sp.*)*", penelitian ini merupakan penelitian lanjutan dari penelitian yang didanai oleh DIKTI pada Program Kreativitas Mahasiswa Penelitian tahun 2009. Oleh karena itu didalam penyelesaian laporan ini penulis ingin mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Dr. Ir. Happy Nursyam, MS selaku dosen pembimbing pertama dan selaku dosen pembimbing PKM-P 2009 atas bimbingan dan kesempatan yang diberikan.
2. Ir. Dwi Setijawati, MS selaku dosen pembimbing kedua atas arahan yang diberikan.
3. Pihak Direktorat Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Departemen Pendidikan atas dana yang diberikan pada Program Kreatifitas Mahasiswa Penelitian (PKM-P) 2009.
4. Sahabat seperjuangan di program studi Teknologi Hasil Perikanan, khususnya angkatan 2005.
5. Semua pihak yang telah banyak membantu dalam pelaksanaan dan penyelesaian laporan ini yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Hanya **Allah SWT** yang Maha mengetahui dan Maha luas ilmu_Nya. Semoga karya tulis ini dapat memberikan informasi bagi semua pihak yang berminat dan memerlukannya.

Malang, 11 Desember 2009

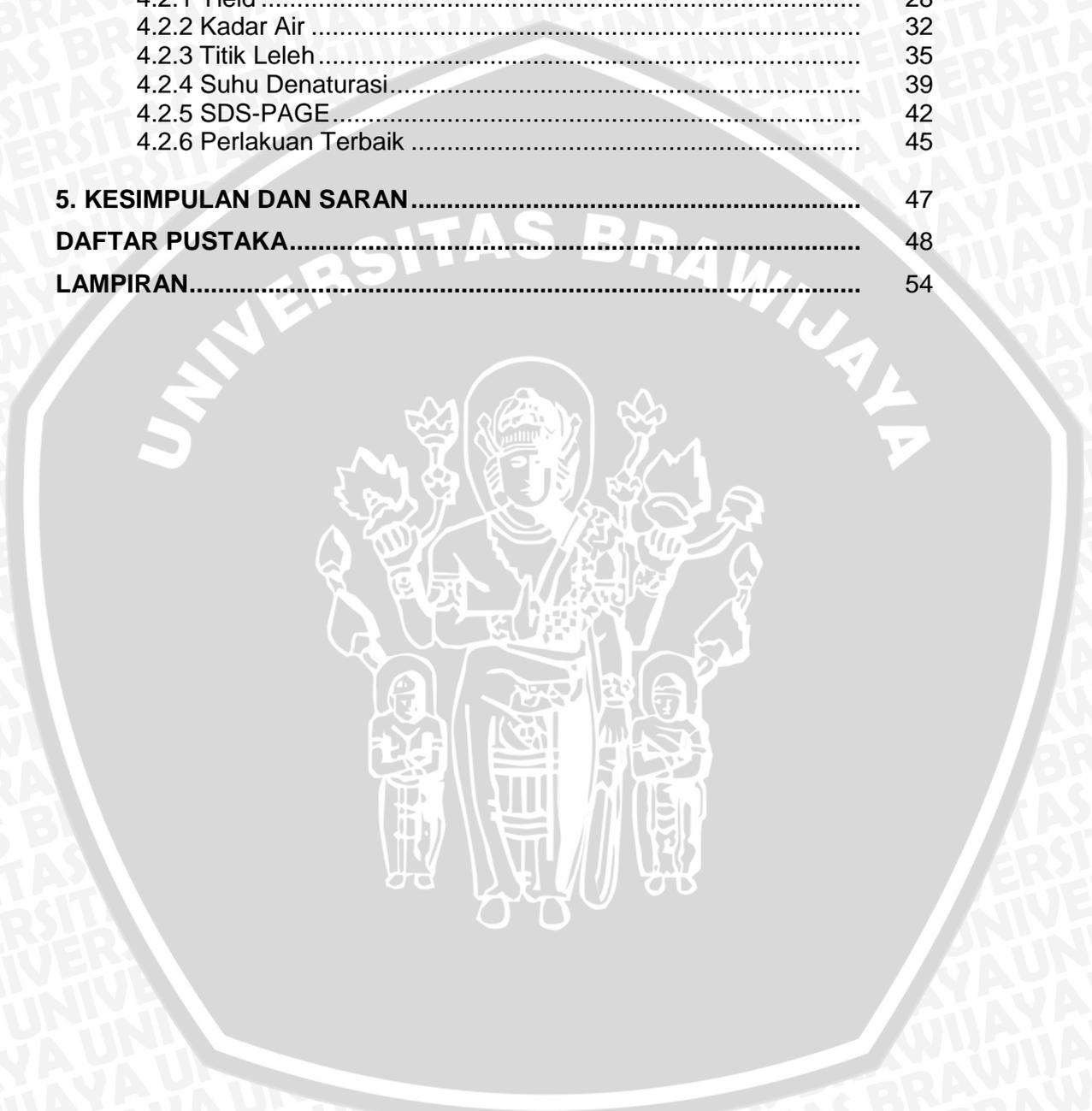
Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	iii
RINGKASAN	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR LAMPIRAN	x
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.4 Kegunaan Penelitian	6
1.5 Hipotesa.....	6
1.6 Waktu dan Tempat.....	6
2. TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Ikan Kakap Merah	7
2.2 Sisik Ikan	8
2.3 Kolagen	9
2.3.1 Definisi Kolagen	9
2.3.2 Struktur dan Komposisi Kolagen	10
2.3.3 Karakteristik Kolagen	11
2.3.4 Jenis Kolagen	12
2.3.5 Kolagen Sisik Ikan	13
2.3.6 Manfaat Kolagen	14
2.4 Ekstraksi Kolagen	15
2.4.1 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Ekstraksi	16
2.5 Macam Metode Ekstraksi Kolagen	17
2.5.1 Larutan Garam Netral	17
2.5.2 Larutan Basa	17
2.5.2 Larutan Asam	18
2.5 Bahan Ekstraksi	19
2.5.1 Asam Asetat	19
2.5.2 Asam Sitrat	19
3. METODOLOGI	21
3.1 Materi Penelitian	21
3.1.1 Alat	21
3.1.2 Bahan	21
3.2 Metode Penelitian	22
3.2.1 Variabel Penelitian	22
3.2.2 Rancangan Penelitian	22

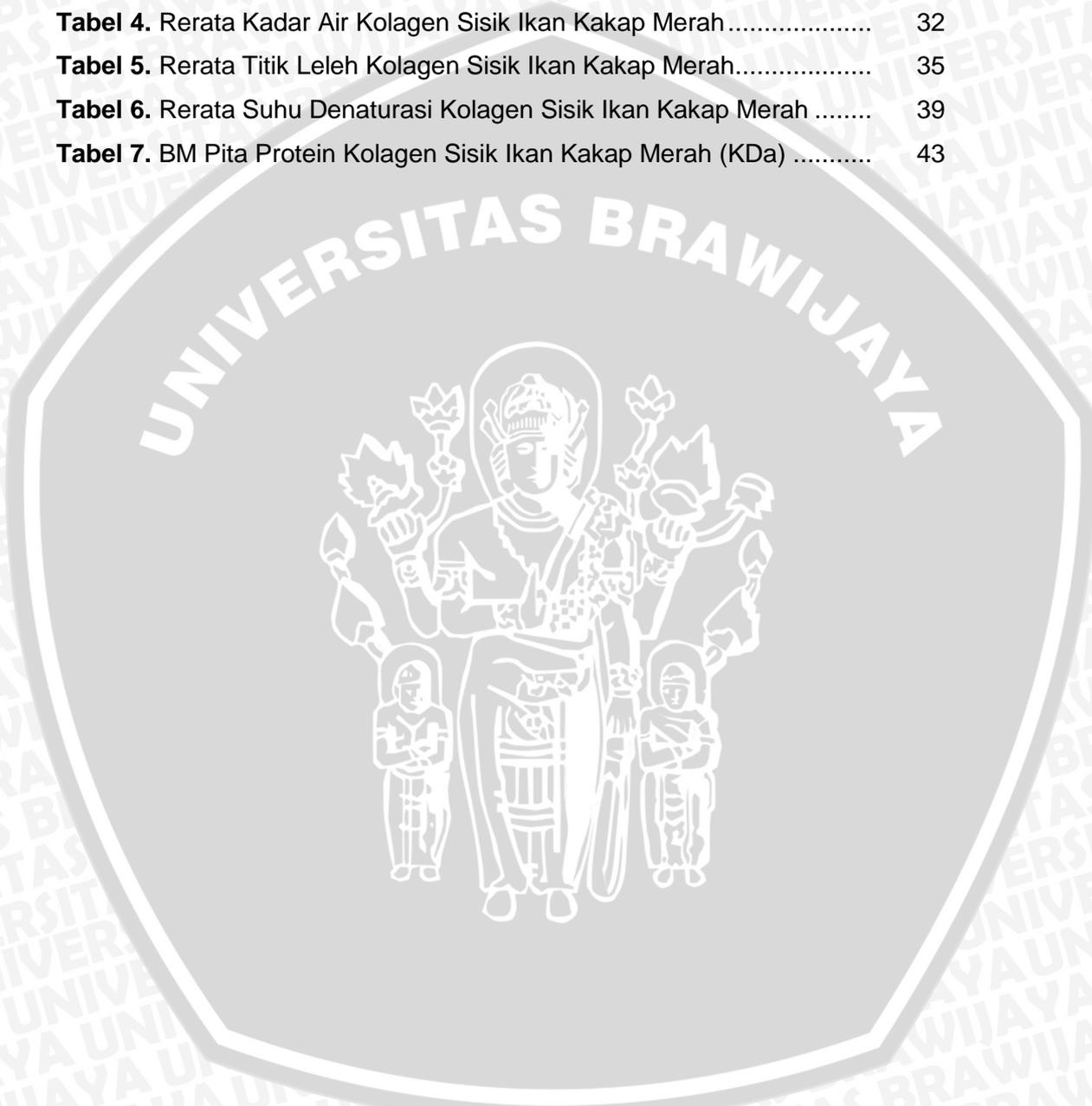


3.3	Prosedur Ekstraksi Kolagen Sisik Ikan	24
3.4	Skema Kerja Ekstraksi Kolagen Sisik Ikan	26
4.	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	27
4.1	Hasil Penelitian	27
4.2	Pembahasan.....	28
4.2.1	Yield	28
4.2.2	Kadar Air	32
4.2.3	Titik Leleh	35
4.2.4	Suhu Denaturasi.....	39
4.2.5	SDS-PAGE.....	42
4.2.6	Perlakuan Terbaik	45
5.	KESIMPULAN DAN SARAN.....	47
	DAFTAR PUSTAKA.....	48
	LAMPIRAN.....	54



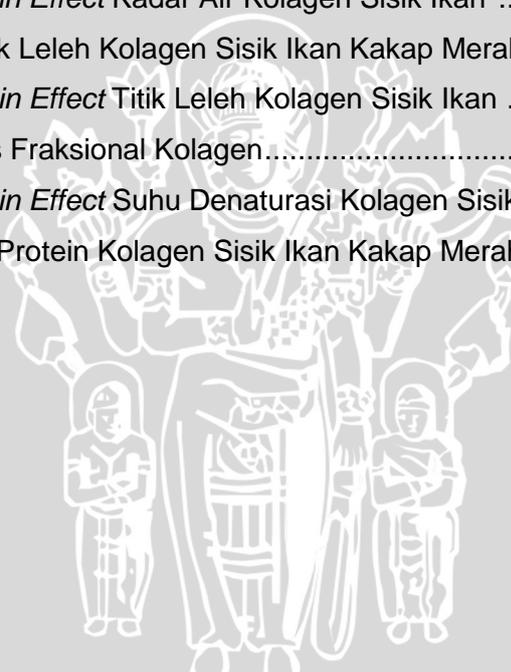
DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Rancangan Penelitian.....	23
Tabel 2. Rerata Hasil Penelitian pada Berbagai Parameter Uji.....	27
Tabel 3. Rerata Yield Kolagen Sisik Ikan Kakap Merah.....	28
Tabel 4. Rerata Kadar Air Kolagen Sisik Ikan Kakap Merah.....	32
Tabel 5. Rerata Titik Leleh Kolagen Sisik Ikan Kakap Merah.....	35
Tabel 6. Rerata Suhu Denaturasi Kolagen Sisik Ikan Kakap Merah	39
Tabel 7. BM Pita Protein Kolagen Sisik Ikan Kakap Merah (KDa)	43



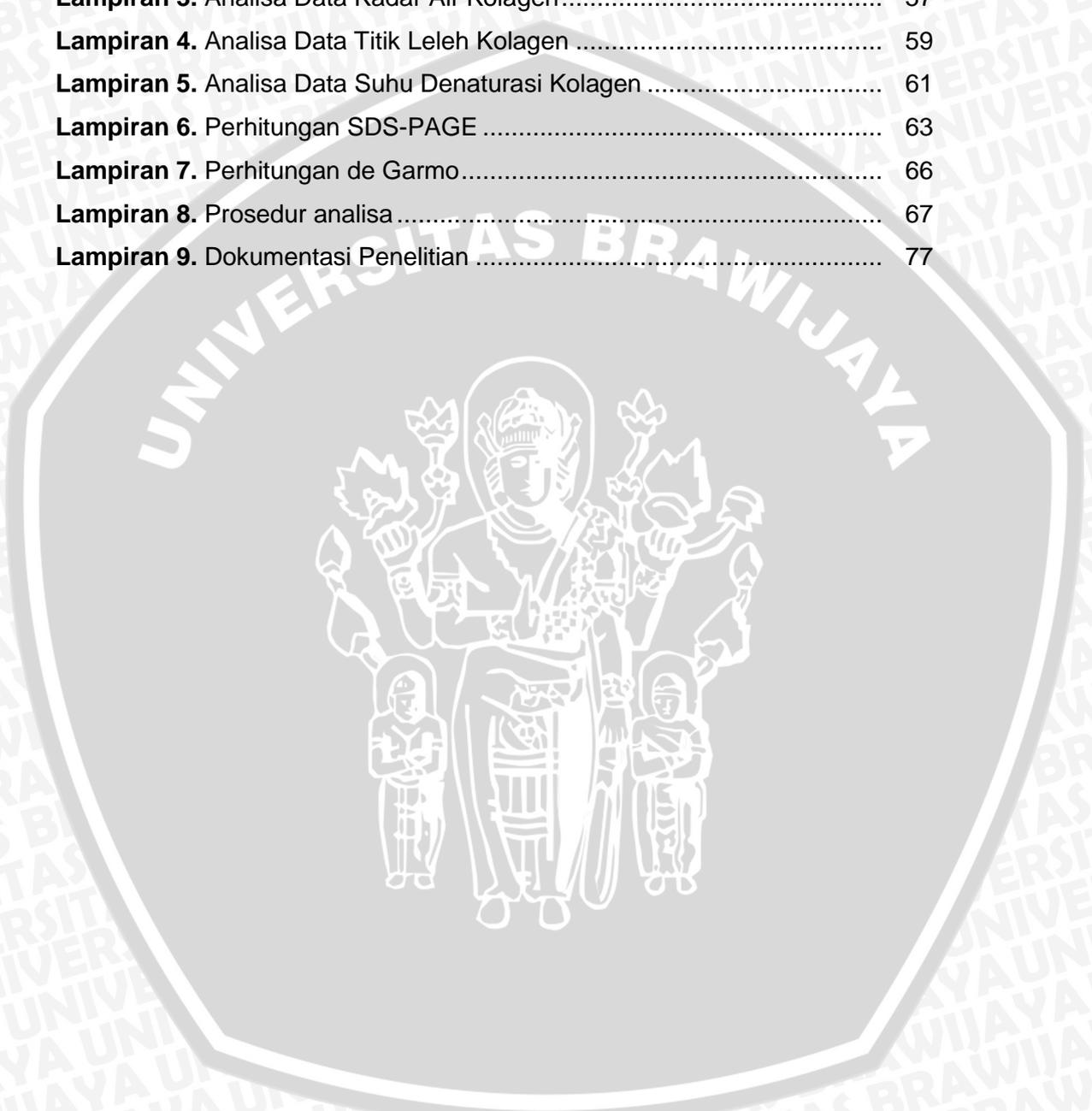
DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Ikan Kakap Merah	7
Gambar 2. Sisik Ikan Kakap Merah.....	8
Gambar 3. Struktur asam amino glisin, prolin dan X	10
Gambar 4. Rantai tunggal dan rantai triple pada collagen helix.....	11
Gambar 5. Molekul tropocollagen dengan ikatannya dan serat kolagen	12
Gambar 6. Kolagen pada sisik ikan.....	14
Gambar 7. Metode ekstraksi kolagen sisik ikan	26
Gambar 8. Grafik Yield Kolagen Sisik Ikan Kakap Merah.....	28
Gambar 9. Grafik <i>Main Effect</i> Yield Kolagen Sisik Ikan	29
Gambar 10. Grafik Kadar Air Kolagen Sisik Ikan Kakap Merah.....	33
Gambar 11. Grafik <i>Main Effect</i> Kadar Air Kolagen Sisik Ikan	36
Gambar 12. Grafik Titik Leleh Kolagen Sisik Ikan Kakap Merah	36
Gambar 13. Grafik <i>Main Effect</i> Titik Leleh Kolagen Sisik Ikan	37
Gambar 14. Viskositas Fraksional Kolagen.....	40
Gambar 15. Grafik <i>Main Effect</i> Suhu Denaturasi Kolagen Sisik Ikan	41
Gambar 16. Pola Pita Protein Kolagen Sisik Ikan Kakap Merah.....	42



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Uji Normalitas Data	54
Lampiran 2. Analisa Data Yield Kolagen.....	55
Lampiran 3. Analisa Data Kadar Air Kolagen.....	57
Lampiran 4. Analisa Data Titik Leleh Kolagen	59
Lampiran 5. Analisa Data Suhu Denaturasi Kolagen	61
Lampiran 6. Perhitungan SDS-PAGE	63
Lampiran 7. Perhitungan de Garmo.....	66
Lampiran 8. Prosedur analisa.....	67
Lampiran 9. Dokumentasi Penelitian	77



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kolagen merupakan bagian protein yang melimpah dalam tubuh mamalia termasuk manusia, terdapat sekitar 25% dari total protein (Ogawa *et.al.*, 2004). Kolagen merupakan bagian dari protein serat atau *protein fibrosa* yang memiliki beberapa rantai polipeptida yang dihubungkan oleh berbagai ikatan silang membentuk *triple helix* (Toha, 2001). Menurut Hsiao, *dkk.* (2008), kolagen mempunyai banyak tipe dimana berbeda fungsinya tergantung dari letaknya pada jaringan. Saat ini, telah ditemukan kolagen yang berasal dari hewan mulai dari tipe I sampai dengan XIX. Pada umumnya, kolagen tipe I sampai dengan tipe V digunakan pada berbagai bidang.

Kolagen yang belum terdenaturasi dapat diaplikasikan pada kosmetik, biomedik, serta industri farmasi. Sedangkan kolagen yang telah terdenaturasi, atau biasa disebut dengan gelatin dapat diaplikasikan pada industri pangan dan biomedik (Rehn *et.al.*, 2001). Friess (1997), menyatakan bahwa kolagen dapat digunakan dalam bidang farmasi, terutama sebagai suatu alat pembawa untuk menyalurkan obat ke dalam tubuh. Ditambahkan oleh Morimura *dkk.* (2001), bahwa kolagen dapat dimanfaatkan sebagai bahan kosmetik, karena hidrolisat kolagen mengandung aktivitas anti radikal bebas.

Meskipun gel yang dihasilkan kolagen ikan bukan merupakan gel yang kuat, tetapi dapat digunakan dengan baik untuk aplikasi industri, contohnya sebagai *micro-encapsulan* dan *edible film* (Heerschap *dkk.*, 2005). Kolagen dapat dimanfaatkan secara meluas dalam bedah kosmetik dan dapat digunakan untuk mengobati pasien luka bakar pada kulit. Kolagen dapat dikombinasikan dengan silikon, *fibroblast*, dan substansi lainnya, berguna sebagai kulit tiruan untuk mengatasi masalah kulit terbakar (Anonymous, 2007).

Pada umumnya, kolagen diisolasi dari kulit hewan ternak, seperti sapi dan babi (Rehn *et.al.*, 2001). Hsiao, *dkk.* (2008) memberikan contoh yaitu, kolagen tipe I dimana terdapat pada matriks ekstraseluler. Kolagen tipe ini diekstraksi dan dimurnikan dari jaringan ikat berbagai organ, seperti tulang, kulit, tendon, dimana merupakan cairan kental dari hewan seperti sapi, babi, burung, ikan.

Padahal kolagen yang terbuat dari kulit ataupun organ dari babi masih bersifat kontroversial, sebab beberapa negara melarang penggunaan babi sebagai bahan pangan karena termasuk bahan yang haram untuk dimakan. Menurut Diaz *dkk.* (2001), terdapat beberapa alasan mengapa penggunaan kolagen yang berasal dari hewan mamalia seperti babi dan sapi dilarang, selain karena aturan agama mengenai pangan halal, terdapat beberapa penyakit bawaan seperti *bovine spongiform encephalopathy (BSE)* dan *the foot-and-mouth disease (FMD)* yang merupakan penyakit hewan ternak yang disebabkan oleh virus. Sehingga pada beberapa tahun terakhir ini, adanya *bovine spongiform encephalopathy (BSE)* dan *the foot-and-mouth disease (FMD)* telah menyebabkan pelarangan ekspor impor kolagen, sehingga membutuhkan alternatif sumber kolagen yang aman, seperti kolagen yang berasal dari hewan air (Trevitt and Singh, 2003).

Kegiatan industri perikanan sejak di tempat pendaratan sampai ke tempat pengolahan ikan umumnya selalu menghasilkan limbah dalam jumlah yang besar, baik limbah cair maupun limbah padat. Limbah padat organik kebanyakan berupa kepala, insang, isi perut, tulang, sirip, kulit dan sisik (Anonymous, 2005). Sisik ikan dapat dimanfaatkan sebagai sumber alternatif pembuatan kolagen karena 27% dari sisik ikan tersebut merupakan protein, dimana 41-84% merupakan protein organik (kolagen dan ichtylepidin) dan sisanya merupakan residu mineral dan garam anorganik seperti magnesium karbonat dan kalsium karbonat (Elliot, 2001). Sisik ikan mudah didapatkan di Indonesia, mengingat

banyaknya industri perikanan yang ada disini. Dari total limbah yang dikeluarkan suatu industri fillet kakap, didapat $\pm 5\%$ merupakan limbah sisik ikan. (Wahyuni dan Rosmawaty, 2007)

Meskipun telah banyak hasil penelitian tentang kolagen dari kulit beberapa biota perairan, masih sedikit informasi kolagen yang berbahan baku sisik ikan. Penelitian oleh Nagai *et.al.* (2003) melaporkan bahwa kolagen yang berasal dari sisik ikan emas yang diekstraksi dengan 0,5 M Asam Asetat dan menghasilkan yield sebesar 7% berat kering. Ditambahkan oleh Nomura *et.al.* (1996) melaporkan bahwa kolagen dari sisik ikan sardine dengan menggunakan 0.05 M Tris-HCl (pH 7.5) mengandung 0.5 M EDTA, menghasilkan yield yang lebih kecil, yaitu sekitar 5 %. Dengan demikian, sisik ikan merupakan sumber yang dapat dimanfaatkan sebagai sumber kolagen karena mempunyai berpotensi menghasilkan kolagen.

Banyak sekali metode yang digunakan dalam mengekstrak kolagen dari suatu bahan. Metode yang efektif dan efisien masih belum diperoleh dalam rangka meningkatkan yield dari kolagen tersebut. Beberapa faktor yang mempengaruhi yield kolagen yang terekstraksi, adalah pengaruh jenis pelarut, dan lama perendaman. Wang (2007) menyatakan bahwa jumlah, lama reaksi, dan jenis pelarut merupakan variable yang penting yang dapat mempengaruhi kemampuan ekstraksi kolagen.

Berangkat dari paparan tersebut, maka perlu adanya pemanfaatan sisik ikan, khususnya ikan kakap merah (*Lutjanus sp.*) sebagai sumber alternatif pembuatan kolagen. Berdasarkan pertimbangan proses ekstraksi yang mudah namun menghasilkan kolagen sisik ikan dalam jumlah besar, maka perlu adanya modifikasi proses. Dengan demikian, diharapkan sisik ikan kakap merah dapat menjadi sumber potensial, sehingga dapat meningkatkan nilai ekonomis limbah industri perikanan.

1.2 Perumusan Masalah

Sisik ikan merupakan limbah yang dihasilkan dari beberapa industri perikanan yang berkembang di Indonesia. Sampai saat ini limbah tersebut dibuang begitu saja, sebagian dimanfaatkan sebagai bahan untuk pembuatan souvenir. Di sisi lain, sisik ikan memiliki sejumlah senyawa yang masih bermanfaat untuk digunakan dalam kehidupan manusia, salah satunya adalah kolagen. Kolagen dapat digunakan dalam bidang pangan, farmasi, dan biomedik.

Keberadaan kolagen dalam sisik ikan terdapat diantara penyusun jaringan ikat sisik ikan. Sifat kolagen adalah mudah merenggang (melunak) apabila kondisi lingkungan keasamannya tinggi ($\text{pH} < 4$). Asam asetat, dan asam sitrat, memiliki sifat keasaman yang berbeda. Maka apabila Bahan direndam dengan lama perendaman tertentu dalam larutan tersebut, maka kolagennya akan larut sehingga mudah dipisahkan dari bahan (Prayitno, 2005).

Penggunaan asam lemah pada proses ekstraksi sangat diutamakan, sebab berdasarkan penelitian oleh Skierka dan Sadowska (2007), penggunaan asam kuat seperti HCL mempunyai kemampuan ekstraksi kolagen yang terburuk, hal ini disebabkan Karena penggunaan asam kuat dengan pH sangat rendah ($\text{pH} < 1$) menyebabkan denaturasi dan penghancuran serat kolagen selama proses ekstraksi. Selain itu penggunaan asam kuat, dapat terjadi pemotongan ikatan peptida yang berlebihan dan menghasilkan kolagen yang berwarna gelap.

Pemilihan asam asetat dan asam sitrat tersebut dikarenakan kedua asam ini merupakan asam yang mudah didapat dipasaran, serta memiliki harga yang murah. Selain itu, kedua asam ini merupakan asam organik yang lebih mudah dimetabolisme oleh tubuh dibanding asam non organik. Dalam penggunaannya pada bidang pangan, kedua asam ini sudah disetujui dan diatur dalam Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia No. 722/Menkes/Per/IX/88, hal ini berarti kedua asam ini aman untuk pangan.

Lama reaksi yang diterapkan memberikan pengaruh pada beberapa penelitian mengenai ekstraksi kolagen. Ogawa *dkk.* (2003) berhasil mengesktraksi kolagen dari ikan *black drum* dan *sea bream* selama 6 hari, sedangkan Nagai *dkk.* (2003) mengekstraksi kolagen dengan memberikan lama reaksi selama 3 hari. Skierka dan Sadowska (2007), menambahkan bahwa kolagen yang terekstrak selama 24 jam akan meningkat seiring dengan bertambahnya waktu menjadi 72 jam.

Maka dari itu, berdasarkan paparan yang telah diuraikan, perlu adanya modifikasi proses mengenai penggunaan jenis pelarut dan lama reaksi yang diberikan. Sehingga diharapkan penelitian ini dapat menjawab masalah :

1. Bagaimana pengaruh jenis larutan asam organik yang berbeda mempengaruhi proses ekstraksi kolagen sisik ikan kakap merah terhadap sifat fisikokimia kolagen yang dihasilkan.
2. Bagaimana pengaruh lama perendaman yang berbeda mempengaruhi proses ekstraksi kolagen sisik ikan kakap merah terhadap sifat fisikokimia kolagen yang dihasilkan.

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan umum penelitian ini adalah mengetahui metode ekstraksi kolagen dari sisik ikan yang optimal dan memberikan nilai tambah terhadap limbah perikanan. Sedangkan tujuan khususnya antara lain adalah :

1. Mengetahui pengaruh jenis larutan asam yang berbeda terhadap sifat fisikokimia hasil ekstraksi kolagen sisik ikan kakap merah.
2. Mengetahui pengaruh lama perendaman yang berbeda terhadap sifat fisikokimia hasil ekstraksi kolagen sisik ikan kakap merah.

1.4 Kegunaan Penelitian

Kegunaan dari penelitian mengenai ekstraksi kolagen sisik ikan kakap merah ini antara lain adalah :

1. Mendapatkan informasi mengenai metode ekstraksi kolagen dari sisik ikan yang efektif dan efisien, sehingga dapat digunakan sebagai acuan untuk penelitian selanjutnya.
2. Memanfaatkan limbah perikanan yang berupa sisik ikan , sehingga dapat meningkatkan nilai ekonomis sisik tersebut.
3. Memberikan alternatif sumber bahan baku pembuatan kolagen.

1.5 Hipotesa

Dari serangkaian paparan rancangan penelitian yang akan dilakukan tersebut, maka dapat diambil dugaan bahwa penggunaan larutan asam dan lama perendaman yang berbeda berpengaruh nyata terhadap sifat fisikokimia kolagen hasil ekstraksi.

1.6 Waktu dan Tempat

Penelitian yang berjudul “Pengaruh Jenis Asam Dan Lama Perendaman Yang Berbeda Terhadap Sifat Fisikokimia Hasil Ekstraksi Kolagen Sisik Ikan Kakap Merah (*Lutjanus Sp.*)” dilaksanakan di laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya pada bulan Agustus-Oktober 2009.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Ikan Kakap Merah

Ikan Kakap dibedakan menjadi dua jenis dan masing-masing diidentifikasi dengan nama kakap merah dan kakap putih. Kakap merah (*Lutjanus sanguineus*) dan kakap putih (*Lates calcarifer*) bukan dari suku yang sama. Ikan kakap merah berasal dari family Centropomidae (Asikin, 1985). Adapun gambar ikan kakap merah seperti pada gambar 1 dibawah ini :



Gambar 1. Ikan Kakap Merah

Klasifikasi kakap merah menurut Soetomo (1997) adalah sebagai berikut ;

- Phylum : Chordata
- Subphylum : Vertebrata
- Class : Osteichthyes
- Subclass : Actinopterygii
- Order : Perciformes
- Suborder : Percoidei
- Family : Lutjanidae
- Subfamily : Lutjanidae
- Genus : *Lutjanus*
- Species : *Lutjanus sp.*

Ikan kakap merah mempunyai ciri-ciri morfologi seperti badan memanjang agak pipih, sirip perut terdiri dari 1 duri keras dan 5 jari lunak, sirip punggung terdiri dari 9-13 duri keras dan 9-17 jari-jari lunak, sirip dubur terdiri dari 3 duri keras dan 7-14 jari-jari lunak, warna bervariasi dari kuning, merah sampai kecoklatan, ukuran yang sering tertangkap antara 40-50 cm. Ikan kakap termasuk ikan yang memiliki jenis sisik cycloid (Asikin, 1985).

2.2 Sisik Ikan

Kegiatan industri perikanan sejak di tempat pendaratan sampai ke tempat pengolahan ikan umumnya selalu menghasilkan limbah dalam jumlah yang besar, baik limbah cair maupun limbah padat. Limbah cair biasanya mengandung bahan organik yang larut air (darah, lendir, drip), dan tidak larut air (lemak). Sedangkan limbah padat organik kebanyakan berupa kepala, insang, isi perut, tulang, sirip, kulit dan sisik (Anonymous, 2005). Pada tahun 1998 volume ekspor sebesar 650.291 ton dan meningkat menjadi 728.942 ton pada tahun 2000. Dengan jumlah ekspor tersebut jika diasumsikan dalam bentuk fillet ikan, maka dihasilkan limbah sisik ikan sebanyak 36.477 ton. Hal ini berdasarkan perhitungan bahwa rendemen limbah sisik ikan sebesar 5%. (Wahyuni dan Rosmawaty, 2007). Sisik ikan yang digunakan seperti pada gambar 2 dibawah ini :



Gambar 2. Sisik Ikan Kakap Merah (*Lutjanus sp.*)

Banyak senyawa kimia yang terkandung dalam sisik ikan, antara lain adalah 41-84% merupakan protein organik (kolagen dan ichtylepidin) dan sisanya merupakan residu mineral dan garam anorganik seperti magnesium karbonat dan kalsium karbonat (Elliot, 2001).

Berdasarkan penelitian Nagai *et.al* (2004), komponen besar yang terdapat di sisik ikan antara lain adalah 70 % air, 27% protein, 1 % lemak, dan 2 % abu. Senyawa organik terdiri dari 40%-90% pada sisik ikan dan selebihnya merupakan kolagen, tanpa memperhatikan spesies ikan tersebut. Saat ini sisik ikan dalam jumlah besar dapat diperoleh dari limbah buangan penjualan ikan atau perusahaan pengolahan ikan. Akan tetapi, pemanfaatan sisik ikan masih rendah.

2.3 Kolagen

2.3.1 Definisi Kolagen

Kolagen merupakan bagian dari protein serat atau *protein fibrosa* yang memiliki beberapa rantai polipeptida yang dihubungkan oleh berbagai ikatan silang membentuk *triple helix* (Toha, 2001).

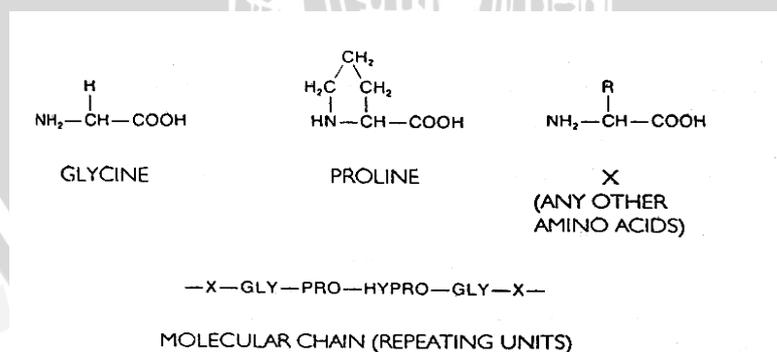
Kolagen merupakan suatu nama umum yang digunakan pada kelompok protein, berupa serat dan banyak ditemukan di kulit, tendon, ligamen, tulang rawan dan tulang keras. Serat kolagen terlihat tidak berwarna dan memiliki banyak cabang dengan ikatan yang seperti ombak, lebar tiap cabang sekitar 1,5 μm . Ketika serat kolagen ditempatkan pada asam asetat 0,01%, maka akan terintegrasi menjadi suatu larutan, dalam bentuk ini kolagen memiliki berat molekul sekitar 300.000 – 360.000 dan panjang tiap molekul 280 nm dengan diameter 1,5 nm. Molekul kolagen yang paling umum dikenal sebagai tropocollagen (Rook et all, 1979).

2.3.2 Struktur dan Komposisi Kolagen

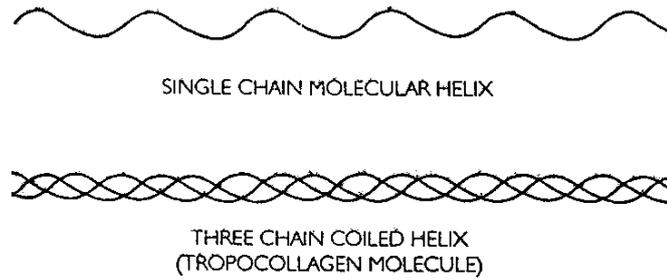
Protein kolagen dibentuk oleh tiga rantai polipeptida, yaitu berupa rantai alfa (α -chain) yang membentuk struktur *triple helix* yang stabil karena adanya ikatan hidrogen di dalamnya. Rantai alfa dibedakan menjadi α_1 , α_2 dan α_3 , walaupun ketiga jenis rantai alfa terdapat di dalam tipe kolagen yang sama tetapi berbeda komposisi asam aminonya (Damodaran dan Paraf, 1997)

Komposisi asam amino pada protein kolagen antara lain : (1) glisin, selalu terdapat pada residu ketiga, (2) prolin, dan (3) turunan dari asam amino, seperti turunan prolin dan lisin yaitu hidroksiprolin dan hidroksilisin (Anonymous, 2007). Struktur glisin, prolin dan asam amino lainnya dapat dilihat pada gambar 2.

Urutan asam amino berulang-ulang mengikuti pola Gly-X-Y , dimana Gly adalah glisin, X dan Y adalah residu asam amino lainnya. Kebanyakan urutan asam amino yang umum dijumpai adalah X untuk prolin dan Y untuk hidroksiprolin. Urutan asam amino tersebut dapat dilihat pada gambar 2. Hidroksiprolin dan hidroksilisin berperan penting dalam menstabilkan struktur globuler dari *tropocollagen* sebaik bentuk akhir dari struktur serat dengan bantuan ikatan kovalen. Hasil dari struktur tersebut disebut sebagai *collagen helix* atau rantai spiral kolagen (Harisson, 2005). Gambar single helix dan triple helix molekul kolagen dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. Struktur asam amino glisin, prolin dan X serta urutan asam amino penyusun kolagen (Damodaran dan Paraf, 1997)



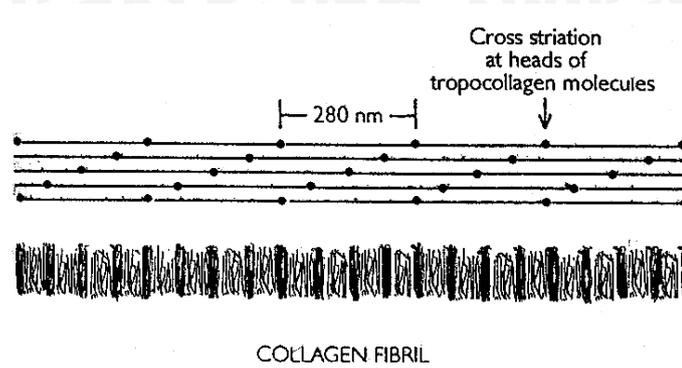
Gambar 4. Rantai tunggal dan rantai triple pada collagen helix

Tiga buah rantai peptida pada kolagen dihasilkan pertama kali di dalam retikulum endoplasma. Beberapa atom C-propeptida datang bersama-sama kemudian ketiga rantai mulai berputar (*propagasi*) ke arah ujung N-terminal dari rantai. Pada proses ini, molekul yang dihasilkan dapat disebut *procollagen*. Setelah itu terjadi pembelahan dimana peptida teronggok, kemudian kolagen yang dihasilkan menyatu dengan kolagen lainnya membentuk serat (Zhao, 2006)

2.3.3 Karakteristik Kolagen

Kolagen termasuk protein ikan berjenis stroma. Menurut Junianto (2003), stroma protein berfungsi untuk membentuk jaringan ikat, dimana protein ini tidak dapat diekstraksi dengan air, larutan asam, larutan alkali atau larutan garam pada konsentrasi 0,01-0,1 M.

Ketidaklarutan kolagen sempat menjadi penghalang dalam penelitian lebih lanjut sampai kemudian ditemukannya *tropocollagen* (molekul kolagen) dari hewan yang usianya lebih muda (Anonymous, 2007). Menurut Zayas (1997), kelarutan kolagen meningkat seiring dengan semakin mudanya usia hewan, karena ikatan silang intermolekul dan ektramolekul protein stroma pada hewan muda lebih sedikit jumlahnya dan lebih labil dibandingkan hewan yang usianya sudah tua.



Gambar 5. Molekul tropocollagen dengan ikatannya dan serat kolagen

Beberapa kolagen memiliki sifat dapat larut pada larutan garam netral, beberapa dapat larut pada asam dan beberapa tidak dapat larut. Kelarutan dari kolagen dipengaruhi oleh ikatan silang yang menyusunnya, kelarutan kolagen akan berkurang jika ikatan silang molekul kolagen bertambah. Ikatan molekul kolagen yang saling bersebelahan dari ujung ke ujung akan membentuk serat kolagen. Serat kolagen disusun secara paralel sehingga menyebabkan daya renggang yang sangat kuat seperti pada tendon (Fennema, 1996)

Serat kolagen dengan ikatan silang yang terbatas akan dipecah dalam pelarut asam atau pada larutan garam netral (Anonymous, 2007). Kolagen terdiri dari beberapa serat putih yang tidak elastis dan memiliki daya regang yang baik. Kolagen yang dilarutkan dalam air mendidih akan terdenaturasi membentuk gel menjadi gelatin (Anonymous, 2005)

2.3.4 Jenis Kolagen

Kolagen dapat ditemukan dimana-mana, merupakan bagian terbesar dari protein pada hewan, sekitar 30% dari total protein hewani. Menurut Nagai (2003), berdasarkan kelarutannya kolagen dapat dibagi menjadi *acid-soluble collagen* (ASC) dan *acid-insoluble collagen* (AIC). Perbedaannya adalah pada suhu tercapainya denaturasi, ASC pada ikan terdenaturasi pada suhu 29°C, sedangkan AIC terdenaturasi pada suhu 28°C.

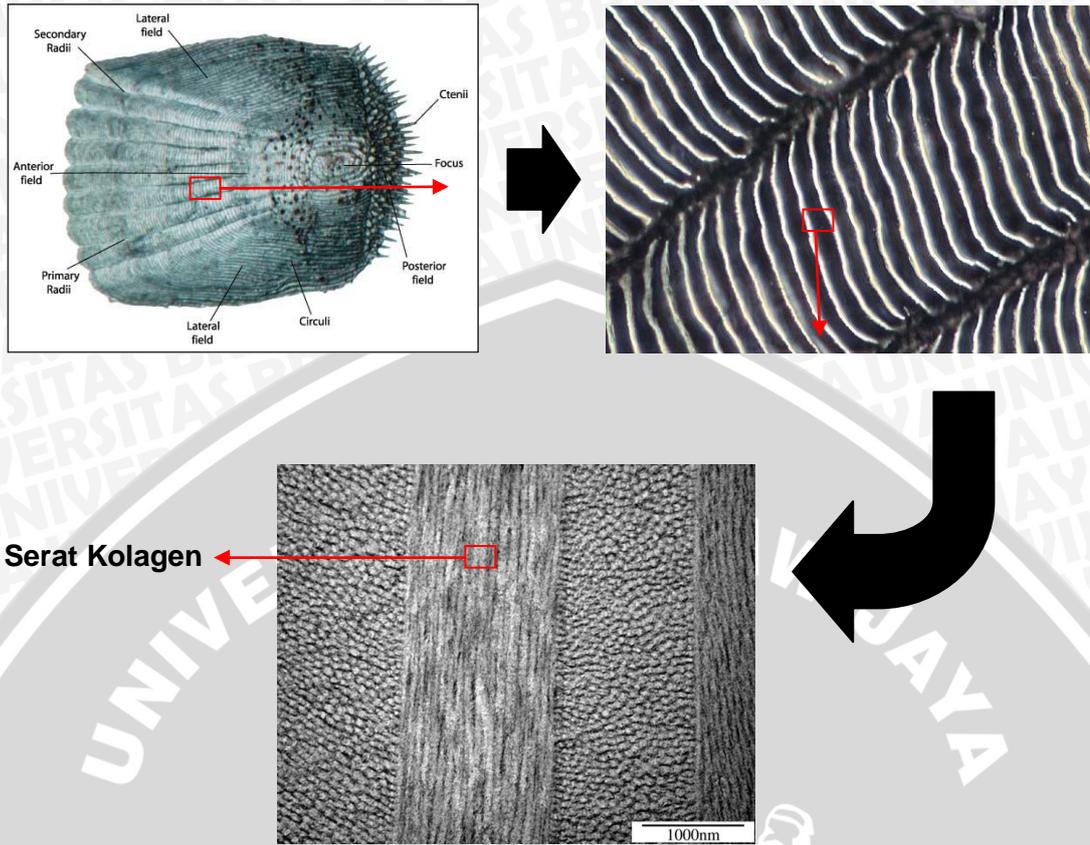
Berdasarkan struktur makromolekul, kolagen dibagi menjadi tiga bagian yaitu (1) kolagen serat kasar, terdiri dari kolagen tipe I, II dan III, (2) kolagen tidak berserat, termasuk kolagen tipe IV atau dasar membran kolagen, dan (3) kolagen serat halus (*microfibrillar*) meliputi kolagen tipe V, IX, dan X (kolagen periseluler), tipe VI dan VII (mikrofibril), sedangkan tipe VIII dan XI belum diklasifikasikan (Damodaran dan Paraf, 1997)

Kolagen tipe I merupakan kolagen yang paling dikenal, ditemukan di seluruh jaringan ikat, termasuk kulit dan tulang. Kolagen tipe I merupakan heteropolimer yang terdiri dari dua buah rantai 1 dan satu buah rantai 2. Kolagen ini mengandung 1-3 glisin, tidak mengandung triptofan dan sistein, serta mengandung sedikit tiroksin dan histidin (Muyonga *et al*, 2003).

Kolagen tipe II merupakan kolagen yang paling banyak ditemukan pada tulang rawan, dibentuk oleh tiga buah rantai alfa 1. Kolagen ini dapat digunakan secara efektif sebagai obat untuk menyembuhkan pasien penyakit rematik dan artritis akut. Kolagen tipe III dibentuk oleh tiga buah rantai alfa 1 dan ditemukan pada darah, luka dan tumor tertentu (Liu *et al*, 2001)

2.3.5 Kolagen pada Sisik Ikan

Pada tiap sisik ikan terdiri dari dua area yang berbeda, yaitu lapisan eksternal (osseus) dan plat internal fibrosa. Pada lapisan eksternal bagian atas, serat kolagen tersusun secara acak dan terikat pada matriks proteoglikan. Sedangkan lapisan fibrosa bagian bawah, senaliknya, serat kolagen berasosiasi dan terorganisasi pada lamella, yang berpengaruh terhadap pembuatan pola lingkaran kayu secara orthogonal. Serat kolagen diproduksi pada lapisan fibrosa oleh scleroblast yang terletak pada dasar dari sisik ikan. Serat tersebut terorganisasi melalui kerjasama antara mikrotubula dan aktin mikrofilamen yang bertujuan untuk penggabungan selama pembentukan plat basal. Adapun letak dari serat kolagen pada sisik ikan dapat dilihat pada gambar 6 dibawah ini :



Gambar 6. Letak serat kolagen pada sisik ikan (Ikoma *et.al.*, 2003)

2.3.6 Manfaat Kolagen

Kolagen pada tubuh memiliki fungsi sebagai perekat untuk menyangga tubuh agar tetap dapat menyambung, tanpa adanya kolagen maka tubuh akan terpisah-pisah (Anonymous, 2007).

Kolagen yang telah dihidrolisa dapat digunakan sebagai sampo, conditioner, perawatan rambut, leave-in, styling products, sabun, body lotion, perawatan tubuh, pembersih, penyegar, pelembab wajah, perawatan wajah, alas bedak, mascara, lipstik, dan kosmetika warna (Anonymous, 2006)

Kolagen dapat dimanfaatkan secara meluas dalam bedah kosmetik dan dapat digunakan untuk mengobati pasien yang terluka bakar pada kulit. Kolagen dapat dikombinasikan dengan silikon, *fibroblast*, dan substansi lainnya, berguna sebagai kulit tiruan untuk mengatasi masalah kulit terbakar (Anonymous, 2007)

Kolagen memiliki kemampuan untuk memberikan sifat elastis pada kulit, dan dapat mengurangi keriput yang terjadi sebagai efek dari penuaan. Kolagen juga banyak ditemukan di kornea mata dalam bentuk kristal. Kolagen pada bidang bedah kosmetik dapat digunakan untuk memperbesar volume bibir (Harrison, 2005)

Kolagen banyak dimanfaatkan dalam bidang medis dan kosmetik. Meskipun gel yang dihasilkan kolagen ikan bukan merupakan gel yang kuat, tetapi dapat digunakan dengan baik untuk aplikasi industri contohnya seperti micro-encapsulasi dan edible film (Heerschap *et al*, 2005).

2.4 Ekstraksi Kolagen

Ekstraksi kolagen adalah suatu cara yang dilakukan dengan tujuan untuk memisahkan komponen kolagen dari komponen-komponen protein. Ada beberapa macam metode ekstraksi kolagen antara lain adalah metode ekstraksi kolagen dengan larutan garam netral, ekstraksi kolagen dengan larutan basa dan ekstraksi kolagen dengan larutan asam.

Penelitian oleh Kimura *et.al.* (1991) melaporkan bahwa kolagen yang berasal dari sisik ikan karper yang diekstraksi dengan 0,5 M Asam Asetat dan menghasilkan yield sebesar 7% berat kering. Ditambahkan oleh Nomura *et.al* (1996) melaporkan bahwa kolagen dari sisik ikan sardine dengan menggunakan 0.05 M Tris-HCl (pH 7.5) mengandung 0.5 M EDTA, menghasilkan yield yang lebih kecil, yaitu sekitar 5 %. Dengan demikian, sisik ikan merupakan sumber yang dapat dimanfaatkan sebagai sumber kolagen karena mempunyai kolagen dalam jumlah besar.

2.4.1 Faktor-faktor yang mempengaruhi Ekstraksi.

a) Ukuran Bahan

Ukuran bahan sangat mempengaruhi proses ekstraksi karena menentukan tingkat kemudahan bahan untuk kontak dengan pelarutnya. Bahan yang akan diekstrak sebaiknya memiliki luas permukaan yang kecil untuk mempermudah kontak antara bahan dengan pelarut sehingga ekstraksi berlangsung dengan baik (Purseglove *dkk*, 1981).

b) Lama dan Suhu Ekstraksi

Semakin lama waktu ekstraksi maka kesempatan untuk bersentuhan makin besar sehingga juga bertambah sampai titik jenuh larut. Akan tetapi penambahan waktu ekstraksi pada larutan yang telah mencapai titik jenuh tidak akan memberikan hasil ekstraksi yang lebih baik bahkan merupakan pemborosan (Komara, 1991). Menurut Voight (1995), faktor yang menentukan hasil ekstraksi adalah jangka waktu dimana bahan tetap kontak dengan cairan pengestraksi (jumlah bahan pengestraksi).

c) Jenis Pelarut

Dalam pemilihan jenis pelarut, pelarut harus dapat melarutkan ekstrak yang diinginkan saja, mempunyai kelarutan yang lebih besar, tidak menyebabkan perubahan secara kimia pada komponen ekstrak, dan titik didih kedua bahan tidak boleh terlalu dekat (Bernasconi *dkk.*, 1995).

d) Jumlah Pelarut

Perbandingan bahan dengan pelarut juga berpengaruh terhadap efisiensi ekstraksi dan mutu ekstrak yang dihasilkan. Semakin besar perbandingan bahan dengan pelarut maka proses pelarutan semakin baik karena antara partikel dalam bahan pelarut semakin sering (Voight, 1995). Akan tetapi jumlah pelarut yang berlebihan tidak akan mengekstrak lebih banyak (Susanto, 1999).

2.5 Macam Metode Ekstraksi Kolagen

Metode ekstraksi kolagen adalah suatu cara yang dilakukan dengan tujuan untuk memperoleh kolagen murni. Ada beberapa macam metode ekstraksi kolagen, diantaranya adalah metode isolasi kolagen dengan ekstraktor larutan garam netral, basa dan asam.

2.5.1 Larutan Garam Netral

Metode ini dilakukan pada suhu 0° - 5°C dengan cara mengekstrak 50 gram sampel jaringan dengan larutan garam sebanyak 50 atau 100 ml selama \pm 18 jam di dalam mesin pengocok. Kemudian ekstrak yang terpisah dari jaringannya disentrifuge pada 80.000 g selama 1 jam. Setelah terbentuk presipitasi dilakukan uji tertentu sesuai yang diinginkan (Gross, *et al*, 1954).

Christner *et al* (2006) menjelaskan ekstraksi kolagen dapat dilakukan dengan cara sebagai berikut: sampel diekstraksi dengan menggunakan 1,0 M NaCl pada suhu 4°C dengan terus di-*shaking* selama 5 hari. Perbandingan kulit (berat basah) dengan pelarut buffer adalah 100 mg / ml. Setelah 5 hari, sampel kulit dipindah dari larutan garam dan diekstraksi kembali dengan asam asetat konsentrasi 0,5M pada suhu 4°C selama 5 hari. Setelah diekstraksi, kulit diujikan.

2.5.2 Larutan Basa

Metode Rivo dalam Pelt-Heerschap *et.al.* (2006) menjelaskan ekstraksi kolagen dari bahan dilakukan pada suhu 16°C yaitu sebagai berikut: bahan dipotong dan diekstraksi menggunakan 0,1 NaOH, kemudian material yang tidak larut diekstraksi dengan 10% butil alkohol, selanjutnya material yang tidak larut tersebut diekstraksi lagi dengan larutan asam HCl pada pH 4. Setelah dibentuk supernatan dan di *freeze drying* lalu dibentuk menjadi bubuk atau tepung kolagen.

Metode Ogawa et al (2004) yang telah dimodifikasi oleh Woo et al (2007) yaitu bahan yang telah bersih diekstraksi dengan 0,5-1,3N NaOH pada suhu 9°C di dalam *shaking incubator* pada 200 rpm selama \pm 12-36 jam. Lalu dinetralkan dengan 6N HCl. Untuk memecah pepsin, 20ml/gr larutan pepsin dimasukkan ke dalam larutan HCl (pH 2) kemudian ditambahkan pada ekstraksi basa tersebut selama 12-36 jam dalam *shaking incubator* pada 200 rpm. Disaring dengan *vacuum-filtered* dan ditambahkan NaCl sebanyak 5-20%, kemudian disentrifuge dingin 4°C pada 10.000 x g.

2.5.3 Larutan Asam

Metode Gomez-Guillen dan Montero (2001) pada Muyonga *et al* (2003) menjelaskan ekstraksi kolagen dapat dilakukan sebagai berikut:

- Bahan dipotong dan dicuci dengan menggunakan air dingin dan mengalir.
- Dicuci dengan 0,8M NaCl sebanyak 3 kali, masing-masing selama 10 menit pada suhu 16°C diikuti pencucian dengan aquades atau air mengalir
- Diekstrak dengan larutan asam asetat 0,5M selama \pm 16 jam pada suhu 16°C (1 gram bahan per 8 ml asam asetat)
- Masing-masing larutan kolagen ditambahkan 0,9 M NaCl
- Disentrifuge dingin pada suhu 4°C, 2500 x g selama 30 menit

Menurut Nagai (2003) Untuk proses ekstraksi kolagen sisik ikan *sea bream*, Sisik dimasukkan dalam larutan asam asetat 0.5 M dan dengan lama perendaman 3 hari dengan perbandingan 1 : 8 (w/v). Setelah itu, didapatkan kolagen terlarut dalam asam. Larutan kental tersebut di presipitasi untuk mengendapkan kolagen dengan menambahkan garam NaCl dengan perbandingan 1 : 2 (v/v) dengan konsentrasi awal 0.9 M hingga mencapai konsentrasi akhir sebesar 2.4 M. Protein kolagen yang mengendap di sentrifuse dingin pada suhu 4 °C dengan kecepatan 5000 rpm selama 15 menit.

2.6 Bahan Ekstraksi

2.6.1 Asam Asetat

Asam asetat (CH_3COOH) dengan berat molekul 60,05 ditemukan dalam bentuk larutan lemah pada hewan dan tumbuhan. Cuka yang telah dikenal selama lebih dari 5000 tahun merupakan suatu larutan yang mengandung $\pm 4 - 12\%$ asam asetat, diperoleh dari fermentasi anggur. Ciri-ciri asam asetat antara lain, tidak berwarna, jernih dan merupakan cairan korosif yang dapat menyebabkan bau yang tajam serta merupakan senyawa yang berbahaya karena dapat merusak kulit dan organ dalam manusia. Sifat korosif ini selaras dengan meningkatnya konsentrasi asam asetat, sehingga dalam penyimpanannya perlu disimpan di dalam ruang dingin, tempat yang kering jauh dari kontak dengan bahan yang mudah teroksidasi. Asam asetat mudah meleleh pada suhu $16,75^\circ\text{C}$ dan mendidih pada suhu $117,9^\circ\text{C}$ (Cheung *et al*, 2005)

Asam asetat pada konsentrasi tertentu dapat digunakan sebagai larutan untuk mengekstraksi senyawa protein menjadi lebih sederhana dalam hal ini digunakan untuk melarutkan protein tertentu. Asam asetat dengan konsentrasi 0,5M lebih mudah melarutkan protein serat seperti kolagen (Nagai, 2003). Proses ekstraksi dengan menggunakan asam asetat dalam kurun waktu yang cukup lama yaitu 14 jam dapat melarutkan kolagen hingga 90% (Skierka dan Sadowska, 2007).

2.6.2 Asam Sitrat

Asam sitrat merupakan asam lemah, pada umumnya digunakan untuk bahan pengawet dan sebaga asidulan. Pada bidang biokimia senyawa ini memiliki peran dalam siklus asam sitrat serta berperan dalam metabolisme hampir diseluruh makhluk hidup. Senyawa ini juga dapat digunakan sebagai antioksidan. Asam sitrat terdapat pada beberapa buah dan sayuran. Paling banyak ditemukan pada buah yang mempunyai rasa asam, seperti lemon. (Anonymous, 2009)

Menurut Prayitno (2006), sifat kolagen adalah mudah merenggang (melunak) apabila kondisi lingkungan keasamannya tinggi (pH dibawah empat). Asam asetat, sitrat, merupakan asam organik yang memiliki sifat keasaman yang berbeda. Maka apabila sisik ikan yang telah dihancurkan direndam dalam larutan tersebut, maka kolagennya akan lepas sehingga mudah dipisahkan dari sisik ikan.



3. METODOLOGI

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Alat

Dalam penelitian ekstraksi kolagen sisik ikan kakap merah ini digunakan beberapa alat yang dibagi menjadi dua bagian, yaitu alat untuk ekstraksi dan alat untuk analisa. Alat untuk ekstraksi terdiri dari toples, baskom, beaker glass 500 ml, beaker glass 1000 ml, spatula, labu ukur 1000 dan 500 ml, timbangan analitik, pipet volume 25 ml, kuvet sentrifuge, *refrigated centrifuge*, dan *freeze dryer*. Sedangkan alat untuk analisa antara lain adalah oven, desikator, *thermocouple*, tabung reaksi, hot plate, rangkaian alat elektroforesis.

3.1.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini dibedakan menjadi dua bagian. Pertama adalah bahan yang digunakan untuk ekstraksi kolagen sisik ikan antara lain adalah asam asetat glasial, asam sitrat, sisik ikan kakap merah, aquades. Kemudian yang kedua adalah bahan-bahan yang digunakan untuk analisa parameter uji kolagen hasil ekstraksi.

3.2 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimen yaitu suatu metode penelitian dengan melakukan observasi pada kondisi buatan (*artificial condition*) yang bertujuan untuk melihat suatu hasil yang menggambarkan suatu hubungan sebab akibat (*causal*) dari variabel-variabel yang diteliti (Nasir, 1999).

Penelitian eksperimen lebih mudah dilakukan di laboratorium karena alat-alat khusus dan lengkap dapat tersedia, dimana pengaruh luar dapat dicegah selama eksperimen (Singarimbun dan Effendi, 1983).

3.2.1 Variabel Penelitian

Variabel penelitian adalah gambaran dari sifat suatu benda yang menjadi obyek penelitian dan mempunyai berbagai macam nilai (Nazir, 1999). Variabel dalam penelitian terdiri dari dua macam, yaitu variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas adalah variabel yang diselidiki pengaruhnya. Sedangkan variabel terikat adalah variabel yang diperkirakan akan timbul sebagai pengaruh dari variabel bebas (Surachmad, 1994).

- a) Variabel bebas yaitu 2 jenis asam organik yang mempunyai keasaman berbeda (asam asetat dan asam sitrat) yang digunakan dan 3 macam lama perendaman yang berbeda (3 hari, 5 hari, dan 7 hari).
- b) Variabel terikat yaitu : yield, kadar air, titik leleh, suhu denaturasi dan pengamatan secara kualitas dengan menggunakan elektroforesis (SDS-PAGE).

3.2.2 Rancangan Penelitian

Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap Faktorial (RAL Faktorial). Perlakuan pertama (Jenis pelarut) yang terdiri dari 2 jenis dan faktor kedua (Lama ekstraksi) yang terdiri dari 3 perlakuan. Ulangan dilakukan sebanyak 4 kali. Metode analisa yang digunakan adalah sidik ragam (ANOVA: *Analysis of Variance*) yang dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ). Model matematika dari Rancangan Acak Lengkap Faktorial (RAL Faktorial) adalah sebagai berikut:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Dimana:

- Y_{ijk} = hasil pengamatan untuk faktor A level ke-i, faktor B level ke-j, pada ulangan ke-k
- μ = rata-rata umum
- α_i = pengaruh faktor A pada level ke-i
- β_j = pengaruh faktor B pada level ke-j

$(\alpha\beta)_{ij}$ = interaksi antara A dan B pada faktor A level ke-i, faktor B level ke-j

ϵ_{ijk} = kesalahan percobaan untuk faktor A level ke-i, faktor B level ke-j pada ulangan ke-k

Apabila hasil keragaman menunjukkan perbedaan ($0,01 < \alpha < 0,05$ atau $\alpha < 0,01$) dilanjutkan dengan uji BNJ.

Rancangan penelitian ini terdiri dari 2 faktor yaitu jenis asam dan lama ekstraksi yang masing-masing diulang sebanyak 4 kali ulangan.

Faktor 1 : Jenis bahan pelarut

A = Asam Asetat

S = Asam Sitrat

Faktor 2 : Lama ekstraksi

a = 3 hari

b = 5 hari

c = 7 hari

Tabel 1. Rancangan Penelitian

Asam	Lama Perendaman	Ulangan			
		1	2	3	4
A (Asetat)	a (3 hari)	Aa ₁	Aa ₂	Aa ₃	Aa ₄
	b (5 hari)	Ab ₁	Ab ₂	Ab ₃	Ab ₄
	c (7 hari)	Ac ₁	Ac ₂	Ac ₃	Ac ₄
S (Sitrat)	a (3 hari)	Sa ₁	Sa ₂	Sa ₃	Sa ₄
	b (5 hari)	Sb ₁	Sb ₂	Sb ₃	Sb ₄
	c (7 hari)	Sc ₁	Sc ₂	Sc ₃	Sc ₄

3.3 Prosedur Ekstraksi Kolagen Sisik Ikan

Dokumentasi prosedur ekstraksi kolagen sisik ikan dapat dilihat pada lampiran 9, sedangkan prosesnya seperti yang diuraikan dibawah ini :

a. Pengambilan sampel

Sampel berupa sisik ikan kakap merah yang diperoleh dari PT VANINUS (Varia Niaga Nusantara) berukuran diameter 0,5 – 1 cm. Sisik yang didapat dibersihkan dan segera dimasukkan dalam *freezer* apabila tidak segera diproses, agar kolagen yang terdapat pada sisik tersebut tetap stabil. Semua tahap preparasi dan ekstraksi dilakukan di suhu 16 °C di laboratorium biologi molekuler, LSIH - Brawijaya. Penggunaan suhu 16 °C ini bertujuan agar kolagen yang terdapat dalam bahan tidak terdenaturasi pada saat ekstraksi. Range suhu kolagen untuk terdenaturasi berkisar antara 19 – 35 °C (Yunoki, 2003).

b. Deproteinasi dengan NaOH 0.1 M

Sisik dipreparasi dengan cara direndam dengan larutan NaOH 0,1 M, selama 3 hari dengan sehari ganti untuk menghilangkan protein non kolagen dan bau. Menurut Zelechowska *dkk* (2009). Penambahan NaOH digunakan untuk menghilangkan protein non kolagen. Deproteinasi merupakan suatu proses yang bertujuan untuk menghilangkan atau melarutkan protein semaksimal mungkin dari substrat, biasa dilakukan dengan menggunakan larutan kimia yang bersifat basa. Hal ini dapat menjadikan protein terlarut menjadi senyawa Na-proteinat (Kurnia, 2006).

c. Delipidasi dengan N-hexan

Kemudian Sisik direndam dengan N-hexan untuk menghilangkan lemak. Proses ini dilakukan selama 1 hari. Sebab dengan adanya lemak pada kolagen dapat menyebabkan ketengikan selama masa simpan.

d. Ekstraksi Kolagen Sisik Ikan

Untuk proses ekstraksi kolagen, Sisik dimasukkan dalam larutan asam berbeda (asam asetat dan asam sitrat) dan dengan lama perendaman yang berbeda (3 hari, 5 hari, 7 hari). Proses ekstraksi ini dilakukan dengan perbandingan 1 : 8 (w/v) (Nagai, 2003). Menurut Prayitno (2006), sifat kolagen adalah mudah merenggang (melunak) apabila kondisi lingkungan keasamannya tinggi (pH dibawah empat). Setelah itu, didapatkan kolagen terlarut dalam asam dengan cara penyaringan menggunakan kain saring.

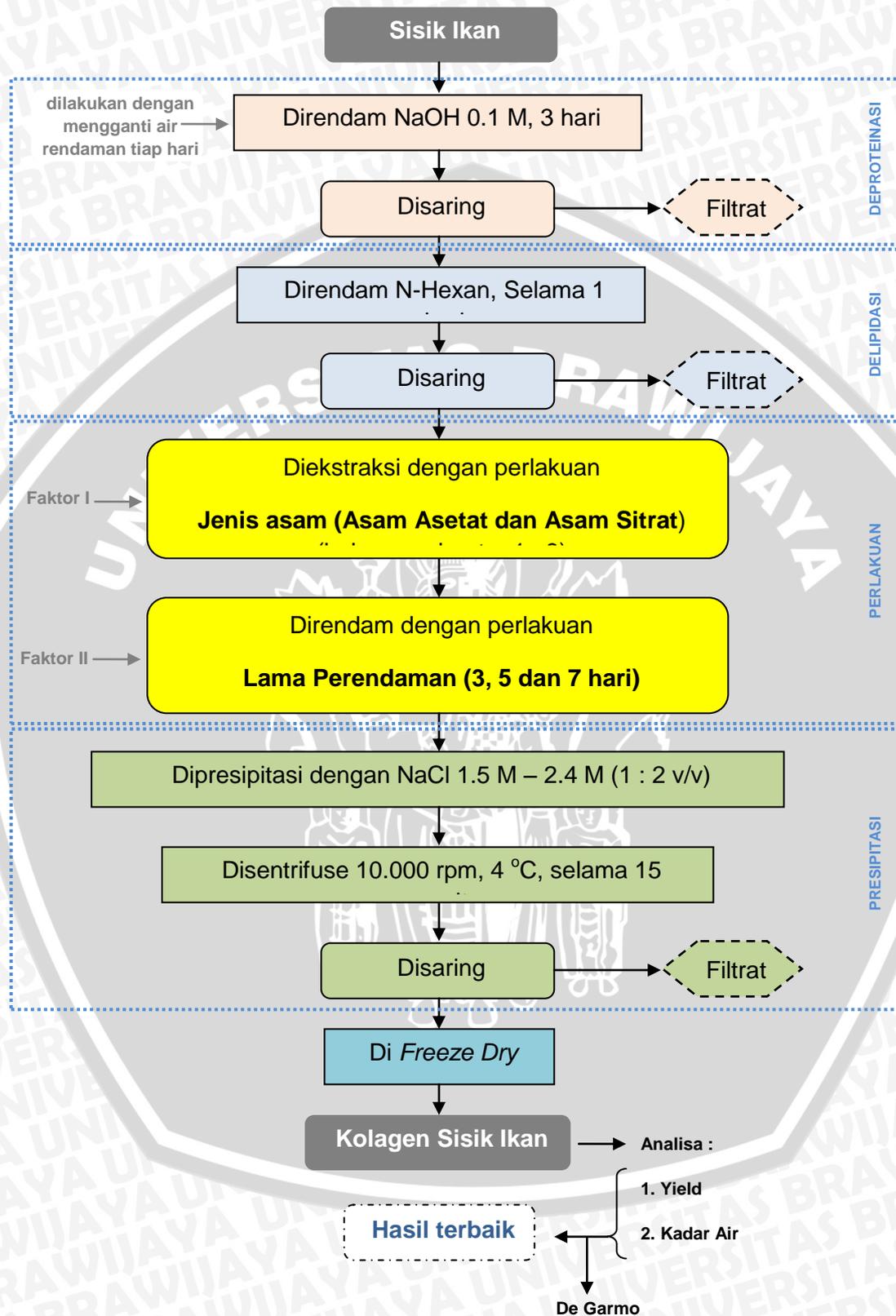
e. Presipitasi kolagen

Larutan kental tersebut di presipitasi untuk mengendapkan kolagen dengan menambahkan garam NaCl dengan perbandingan 1 : 2 (v/v) dengan konsentrasi awal 1.5 M hingga mencapai konsentrasi akhir sebesar 2.4 M. Garam dapat menghasilkan banyak arti, hal ini menuju pada proses *salting-in* dan *salting-out*, didasarkan pada pengaruh garam terhadap kelarutan protein (Franks, 1993).

f. Sentrifugasi

Protein kolagen yang mengendap di sentrifuse dingin pada suhu 4 °C dengan kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit. Pelet yang didapat di *Freeze Dry* dan siap untuk dilakukan analisa parameter uji yang berupa : yield, titik leleh, kadar air, suhu denaturasi dan parameter kualitas berupa SDS-PAGE.

3.4 Skema Kerja Ekstraksi Kolagen Sisik Ikan Kakap Merah (*Lutjanus sp.*)



Gambar 7. Metode ekstraksi kolagen sisik ikan (modifikasi Nagai *et.al.*, 2003)

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Penelitian

Hasil pengamatan dari penelitian yang berjudul “Pengaruh Jenis Asam Dan Lama Perendaman Yang Berbeda Terhadap Sifat Fisikokimia Hasil Ekstraksi Kolagen Sisik Ikan Kakap Merah (*Lutjanus Sp.*)” adalah sebagaimana yang tertera pada tabel 2 dibawah ini. Berdasarkan uji normalitas data (lampiran 1), didapatkan data yang terdistribusi normal ($p > 0.05$). Adapun analisa yang dilakukan adalah perhitungan Yield, Titik Leleh, Kadar Air, dan Suhu Denaturasi.

Tabel 2. Rerata Hasil Penelitian pada Berbagai Parameter Uji

No.	Parameter Uji	Jenis Perlakuan					
		Aa	Ab	Ac	Sa	Sb	Sc
1.	Yield	9.37 ± 0.259 b	24.37 ± 0.451 e	25.10 ± 0.095 e	4.32 ± 0.277 a	11.85 ± 0.164 c	19.43 ± 0.213 d
2.	Kadar Air	88.43% ± 0.32 e	84.41% ± 0.30 c	82.39% ± 0.28 b	85.66% ± 0.16 d	82.45% ± 0.17 b	81.53% ± 0.34 a
3.	Titik Leleh	40.25 ± 0.50 a	43.5 ± 0.58 bc	45 ± 0.82 c	39 ± 0.82 a	42.5 ± 0.58 b	44 ± 0.82 bc
4.	Suhu denaturasi	32.7 ± 0.216 a	32.0 ± 3.266 a	32.3 ± 1.708 a	31.3 ± 2.217 a	31.8 ± 1.500 a	31.5 ± 1.291 a

Keterangan :

- Aa : Pelarut Asam Asetat, Lama Perendaman 3 Hari
- Ab : Pelarut Asam Asetat, Lama Perendaman 5 hari
- Ac : Pelarut Asam Asetat, Lama Perendaman 7 hari
- Sa : Pelarut Asam Sitrat, Lama Perendaman 3 hari
- Sb : Pelarut Asam Sitrat, Lama Perendaman 5 hari
- Sc : Pelarut Asam Sitrat, Lama Perendaman 7 hari

4.2 Pembahasan

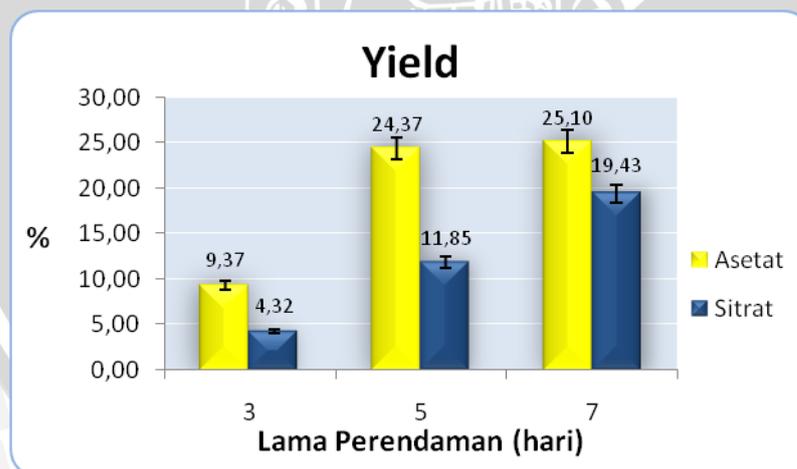
4.2.1 Yield

Tabel 3. Rerata Yield Kolagen Sisik Ikan Kakap Merah

Perlakuan		Yield (%)
Jenis Asam	Lama Ekstraksi	
Asetat (A)	3 hari (a)	9,37 ± 0,259 ^b
Asetat (A)	5 hari (b)	24,37 ± 0,451 ^e
Asetat (A)	7 hari (c)	25,10 ± 0,095 ^e
Sitrat (S)	3 hari (a)	4,32 ± 0,277 ^a
Sitrat (S)	5 hari (b)	11,85 ± 0,164 ^c
Sitrat (S)	7 hari (c)	19,43 ± 0,213 ^d

*Ket : Data merupakan rerata dari 4 ulangan

Hasil dari analisa sidik ragam (lampiran 2), didapatkan bahwa perlakuan dengan penggunaan jenis asam dan lama perendaman yang berbeda berpengaruh nyata ($P < 0.05$) terhadap yield kolagen sisik ikan yang dihasilkan. Berdasarkan hasil penelitian, rerata yield dari kolagen sisik ikan dapat dilihat pada Tabel 3 di atas.



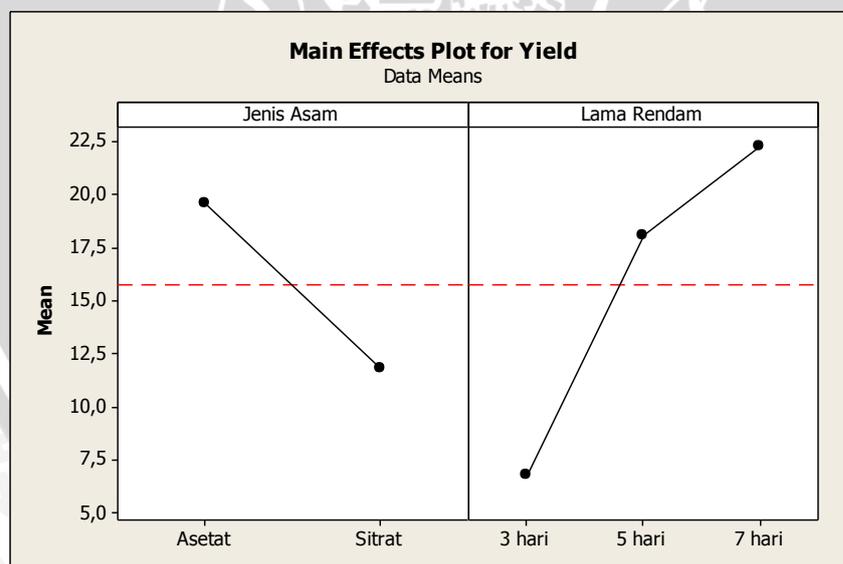
Gambar 8. Yield Kolagen Sisik Ikan Kakap Merah

Yield diperoleh dengan mengumpulkan endapan berwarna putih yang telah dipisahkan menggunakan alat *sentrifuge dingin*, dimana endapan tersebut merupakan kolagen dalam berat basah. Presentase yield merupakan selisih dari

berat bahan baku sebelum ekstraksi dengan kolagen basah setelah proses presipitasi.

Nilai kisaran yield kolagen sisik ikan antara $9,37 \pm 0,259\%$ sampai dengan $25,10 \pm 0,095 \%$ untuk penggunaan pelarut asam asetat, dan berkisar antara $4,32 \pm 0,277 \%$ sampai $19,43 \pm 0,213 \%$ dengan pelarut asam sitrat. Dalam hal ini, penggunaan asam asetat dengan lama perendaman 7 hari merupakan perlakuan yang paling efektif untuk digunakan dalam ekstraksi kolagen dengan yield sebesar $25,10 \pm 0,095 \%$. Sedangkan Asam sitrat dengan lama perendaman 3 hari merupakan perlakuan terjelek, sebab hanya dapat mengekstraksi kolagen dengan yield sebesar $4,32 \pm 0,277 \%$. Perbedaan yield yang didapat disajikan pada gambar 8.

Dari grafik *main effect plot* yield pada gambar 9 di bawah ini, Asam asetat merupakan pelarut yang lebih baik dibandingkan asam sitrat dan semakin lama, yield yang dihasilkan semakin meningkat.



Gambar 9. Grafik *Main Effect* Yield Kolagen Sisik Ikan Kakap Merah

Berdasarkan hasil perhitungan menggunakan uji lanjut BNJ, perlakuan penggunaan jenis pelarut yang berbeda memberikan pengaruh yang nyata ($P < 0.05$). Pengaruh dari perlakuan tersebut, dapat dilihat pada gambar 2 di atas.

Asam asetat merupakan pelarut yang paling efektif dalam melarutkan kolagen sisik ikan. Hal ini dapat disebabkan karena adanya perbedaan pH antara dua pelarut yang berbeda. Menurut Vodjani (1996) dalam Jongjareonrak *et al* (2005), pada umumnya kelarutan kolagen akan lebih besar pada kisaran pH 1 sampai 4, dan akan menurun saat pH dinaikkan sampai 7. Dan kelarutannya akan kembali naik perlahan sampai pH 10. Seiring dengan pH yang menurun atau meningkat dari pH isoelektrik (pI), kelarutan akan meningkat dengan adanya gaya tolakan antar ikatan.

Perbedaan ini juga dipengaruhi oleh besar daya swelling yang disebabkan oleh masing-masing pelarut. Menurut Cheng, *et.al.* (2008), kapasitas *swelling* merupakan faktor sangat penting dalam ekstraksi kolagen karena hal tersebut dapat melemahkan kemampuan ikatan antara struktur kolagen intramolekul dan meningkatkan peregangan protein melalui perusakan ikatan non kovalen. Oleh karena itu, besar kecil swelling berhubungan dengan besar kecil konstanta ionisasi dari berbagai macam asam. Beberapa macam asam yang digunakan antara lain adalah asam asetat dan asam sitrat, dimana asam sitrat memiliki $pK_a = 7,4 \times 10^{-4}$ yang nilainya lebih besar daripada asam asetat dengan $pK_a = 1,7 \times 10^{-4}$. Perbedaan besar dari K_a masing-masing asam ini sesuai dengan hasil yield kolagen hasil ekstraksi yang dihasilkan.

Gómez-Guillén and Montero (2001) menyatakan bahwa, asam kuat (K_a tinggi dan pH rendah) merupakan pelarut yang lebih baik untuk meningkatkan yield dari ekstraksi kolagen. Akan tetapi, telah diteliti bahwa dengan penggunaan pH yang sangat rendah ($<2,0$) akan menyebabkan denaturasi dan kerusakan kolagen selama proses ekstraksi. Skiersa dan Sadowska (2007) juga menambahkan bahwa kolagen akan semakin meningkat derajat *swelling* (mengembang) pada pH mendekati 3. Sehingga ketika dipresipitasi yield kolagen yang diperoleh akan semakin tinggi.

Lama perendaman juga berpengaruh sangat nyata pada yield hasil ekstraksi ($P>0,01$). Dapat dilihat pada gambar 2. Bahwa semakin lama perendaman dalam proses ekstraksi kolagen, maka semakin banyak pula kolagen yang terekstraksi. Semakin banyak kolagen yang terekstraksi maka semakin besar pula yield yang dihasilkan. Menurut Li (2004), semakin banyaknya yield kolagen yang dihasilkan adalah hasil dari proses hidrolisis yang semakin lama, sehingga proses melarutnya kolagen semakin meningkat. Proses perendaman ini dapat merenggangkan ikatan kolagen dalam bahan. Prayitno (2006), sifat kolagen adalah mudah merenggang (melunak) apabila kondisi lingkungan keasamannya tinggi (pH dibawah empat). Asam asetat, sitrat, merupakan asam organik yang memiliki sifat keasaman yang berbeda. Maka apabila sisik ikan yang telah dihancurkan direndam dalam larutan tersebut, maka kolagennya akan lepas sehingga mudah dipisahkan dari sisik ikan

Pada lama perendaman dengan menggunakan asam asetat, waktu 5 hari (Ab) tidak berbeda nyata dengan waktu 7 hari (Ac), sehingga 5 hari dapat dikatakan sebagai lama perendaman yang optimal, sebab tidak memerlukan waktu yang lama untuk menghasilkan jumlah kolagen yang sama dengan waktu lebih lama lagi. Hal ini dapat disebabkan karena kemampuan ekstraksi dan jumlah kolagen yang ada di dalam sisik ikan sudah terekstraksi dengan asam secara total menggunakan asam.

...perbandingan...??

4.2.2 Kadar Air

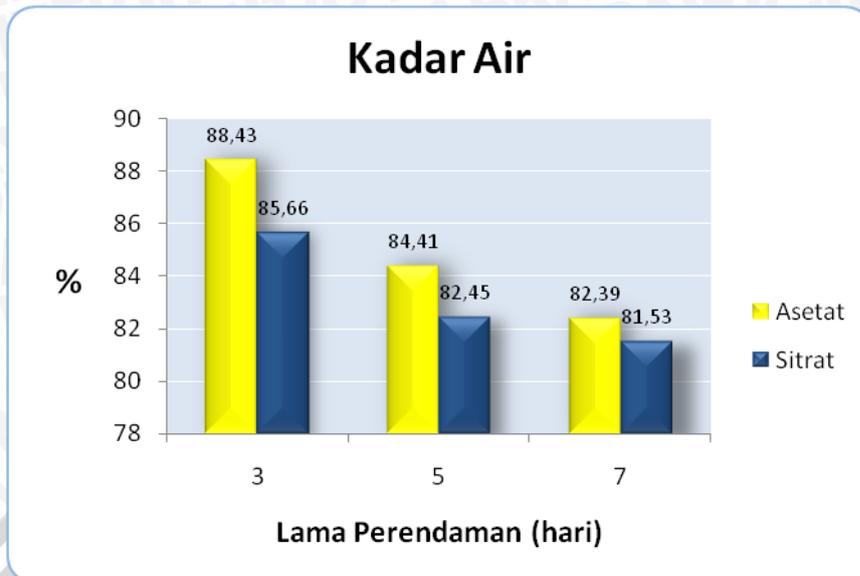
Tabel 4. Rerata Kadar Air Kolagen Sisik Ikan Kakap Merah

Perlakuan		Kadar air (%wb)
Jenis Asam	Lama Ekstraksi	
Asetat (A)	3 hari (a)	88,43% ± 0,003211 ^d
Asetat (A)	5 hari (b)	84,41% ± 0,003023 ^b
Asetat (A)	7 hari (c)	82,39% ± 0,002893 ^a
Sitrat (S)	3 hari (a)	85,66% ± 0,001621 ^e
Sitrat (S)	5 hari (b)	82,45% ± 0,001757 ^c
Sitrat (S)	7 hari (c)	81,53% ± 0,003422 ^b

*Ket : Data merupakan rerata dari 4 ulangan

Hasil dari analisa sidik ragam (lampiran 3), didapatkan bahwa perlakuan dengan penggunaan jenis asam dan lama perendaman yang berbeda berpengaruh nyata ($P < 0.05$) terhadap kadar air kolagen sisik ikan yang dihasilkan. Berdasarkan hasil penelitian, rerata kadar air dari kolagen sisik ikan dapat dilihat pada Tabel 4 di atas.

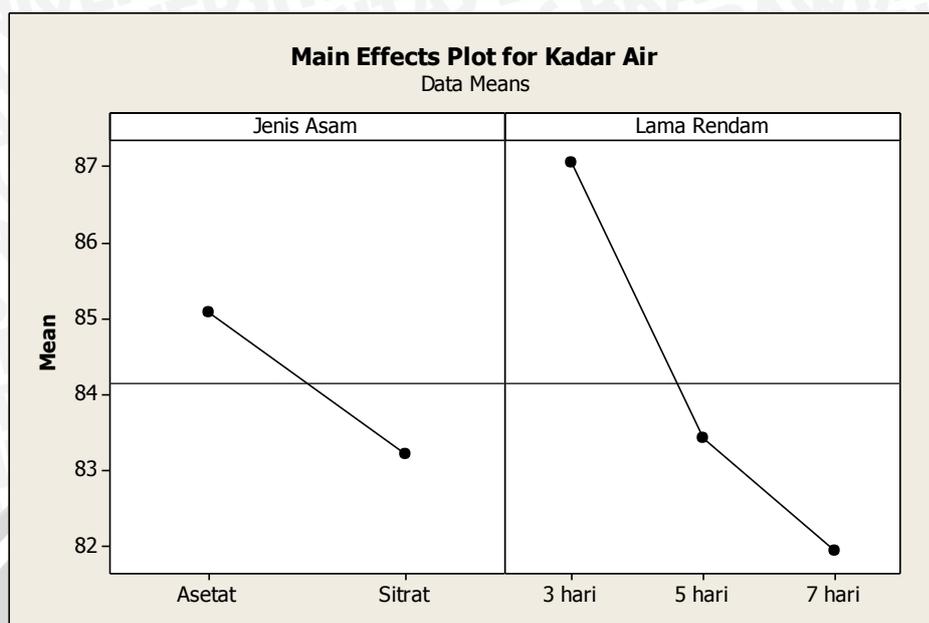
Kadar air kolagen (wb) dari hasil penelitian dengan pelarut asam asetat berkisar antara $81,53\% \pm 0.003422$ hingga $85,66\% \pm 0.001621$, dan berkisar antara $82,39\% \pm 0.002893$ sampai $88,43\% \pm 0.003211$ dengan pelarut asam sitrat. Perlakuan dengan menggunakan asam asetat dengan lama perendaman 7 hari merupakan hasil kadar air terendah yaitu dengan kadar air sebesar 81,53%. Sedangkan pada perlakuan dengan ekstraktor asam sitrat selama 3 hari memiliki kadar air tertinggi sebesar 88,43%.



Gambar 10. Grafik Kadar Air Kolagen Sisik Ikan Kakap Merah

Kadar air kolagen yang diperoleh termasuk tinggi. Von Hippel dan Wong (1962) dalam Zanoboni *et al* (2000), menyatakan bahwa kolagen adalah protein yang banyak mengandung air. Kadar air pada kolagen hasil ekstraksi ini didapat dari berat basah kolagen sebelum dikeringkan dengan menggunakan *freeze dryer*. Rerata dari kolagen sisik ikan hasil ekstraksi disajikan pada Gambar 10.

Dari grafik *main effect plot* kadar air pada gambar 11 di bawah ini, perlakuan jenis asam dan lama perendaman memberikan pengaruh nyata. Asam asetat merupakan pelarut yang mengakibatkan kadar air pada kolagen lebih rendah dibandingkan dengan asam sitrat. Selain itu, juga terlihat bahwa semakin lama, semakin rendah kadar air yang dihasilkan dari kolagen hasil ekstraksi.



Gambar 11. Grafik *Main Effect Plot* Kadar Air Kolagen Sisik Ikan

Dengan perhitungan menggunakan analisis BNJ (lampiran 3), kadar air dengan perlakuan perendaman selama 5 dan 7 hari dengan asam asetat tidak berbeda nyata, begitu pula dengan menggunakan asam sitrat. Penggunaan asam sitrat menghasilkan kolagen hasil ekstraksi dengan kadar air yang lebih rendah dibandingkan dengan penggunaan pelarut asam asetat. Tingginya kadar air pada kolagen tersebut disebabkan oleh lemahnya ikatan kolagen terhadap air pada pH rendah. Menurut Skierka dan Sadowska (2007), pada pH yang sangat rendah (sitrat), dapat mengurangi kemampuan penyerapan air pada kolagen. Hal ini disebabkan adanya gugus amina pada protein kolagen berikatan dengan gugus anion pelarut, sehingga mengurangi gaya elektrostatis pada ikatan tersebut. Akibatnya, struktur dari kolagen menjadi lebih erat, kemampuan untuk mengikat air berkurang, serta kemampuan kolagen untuk larut berkurang. Dibawah pH 2 protein dapat terdenaturasi. Serat kolagen menyusut sehingga tidak mungkin mengalami hidrasi protein. Karena itu, kadar air dengan menggunakan asam sitrat lebih rendah daripada asetat.

Lama perendaman juga memiliki pengaruh yang nyata terhadap kadar air kolagen sisik ikan kakap merah ($P < 0.05$). Terlihat pada gambar 5 di atas, bahwa semakin lama kadar air semakin menurun. Diduga pengaruh ini disebabkan karena dengan semakin lama proses perendaman, maka semakin banyak terjadinya proses pemecahan ikatan kovalen antar molekul kolagen sehingga daya ikat air sekitar molekul tersebut menurun. Martin *et al* (1987) menyatakan bahwa hidrolisis kolagen merupakan suatu peristiwa putusya ikatan kovalen asam amino dengan penambahan air oleh katalis asam, basa atau enzim. Peristiwa menurunnya kadar air diduga disebabkan karena semakin lama asam amino yang terekstraksi akan mengendap dan membentuk suatu ikatan peptida yang menghasilkan air, sehingga air pada kolagen keluar dan berkurang. Menurut Martin (1998), ikatan peptida adalah ikatan kimia yang terbentuk dari 2 molekul asam amino ketika gugus karboksil berikatan dengan gugus amina, yang menghasilkan air. Peristiwa ini merupakan reaksi sintesis dehidrasi yang terjadi antara molekul asam amino. Hal ini didukung oleh hasil elektroforesis dengan pita BM yang tinggi.

Perbandingan saran

4.2.3 Titik Leleh

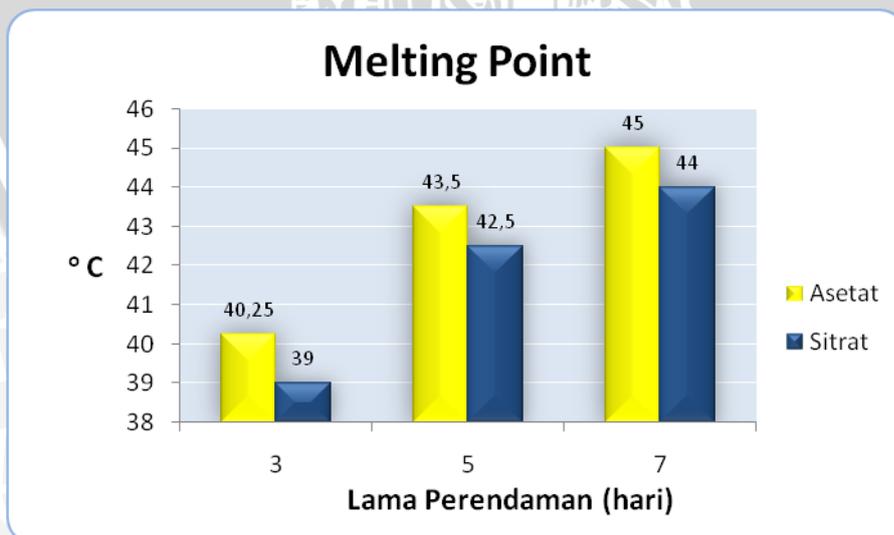
Tabel 5. Melting Point Kolagen Sisik Ikan Kakap Merah

Perlakuan		Melting Point (°C)
Jenis Asam	Lama Ekstraksi	
Asetat (A)	3 hari (a)	40,25 ± 0,50 ^a
Asetat (A)	5 hari (b)	43,5 ± 0,58 ^{bc}
Asetat (A)	7 hari (c)	45 ± 0,82 ^c
Sitrat (S)	3 hari (a)	39 ± 0,82 ^a
Sitrat (S)	5 hari (b)	42,5 ± 0,58 ^b
Sitrat (S)	7 hari (c)	44 ± 0,82 ^{bc}

*Ket : Data merupakan rerata dari 4 ulangan

Hasil dari analisa sidik ragam (lampiran 4), didapatkan bahwa perlakuan dengan penggunaan jenis asam dan lama perendaman yang berbeda berpengaruh nyata ($P < 0.05$) terhadap yield kolagen sisik ikan yang dihasilkan. Akan tetapi, lama perendaman dan jenis asam tidak memberikan pengaruh yang nyata terhadap derajat melting point kolagen sisik ikan, hal ini berarti perlakuan dapat dipisahkan. Berdasarkan hasil penelitian, rerata melting point dari kolagen sisik ikan dapat dilihat pada Tabel 5 di atas.

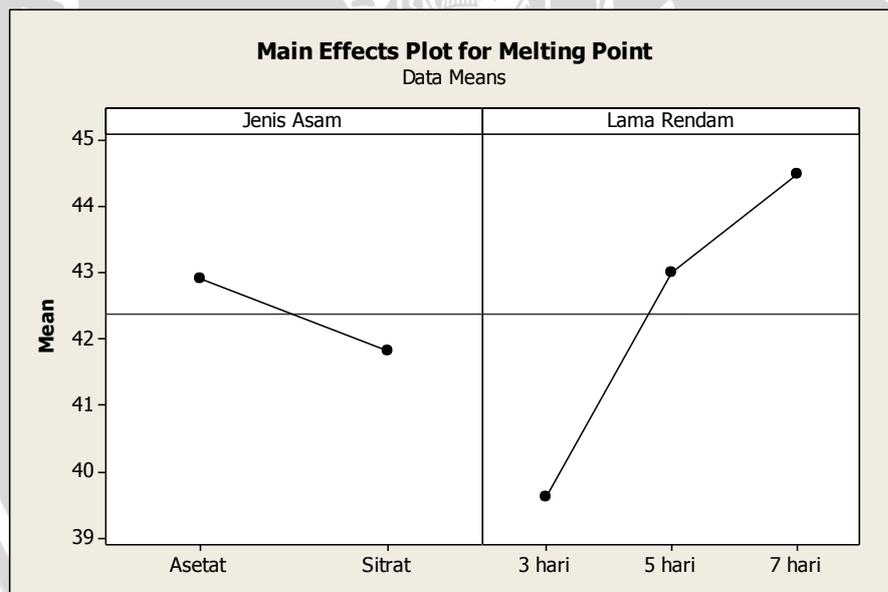
Jika kolagen diberi perlakuan pemanasan maka akan terbentuk gelatin, sehingga dapat disimpulkan bahwa titik leleh kolagen berada lebih rendah dibandingkan melting point pada gelatin. Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa rerata titik leleh kolagen sisik ikan dengan jenis asam dan lama perendaman yang berbeda berkisar antara $39 \pm 0,82 - 44 \pm 0,82$ °C. Perlakuan perendaman menggunakan sitrat selama 3 hari menghasilkan titik leleh terendah, sedangkan dengan asetat dengan lama rendam 7 hari menghasilkan titik leleh tertinggi. Rerata titik leleh kolagen sisik ikan kakap merah disajikan pada gambar 12 dibawah.



Gambar 12. Grafik Titik Leleh Kolagen Sisik Ikan Kakap Merah

Titik leleh atau *melting point* kolagen diperoleh dengan menaikkan suhu kolagen dalam bentuk basah sedikit demi sedikit sehingga kolagen berubah dari bentuk padat menjadi cair. Titik leleh umumnya digunakan untuk mengidentifikasi atau mencirikan komponen organik dan menentukan kemurnian suatu substansi, sehingga melalui titik leleh dapat diketahui kualitas suatu kolagen.

Dari grafik *main effect plot* yield pada gambar 13 di bawah ini, perlakuan jenis asam dan lama perendaman memberikan pengaruh nyata. Asam asetat merupakan pelarut yang mengakibatkan suhu titik dimana kolagen meleleh menjadi lebih tinggi. Selain itu, juga terlihat bahwa semakin lama proses perendaman, semakin tinggi derajat titik leleh yang dihasilkan dari kolagen hasil ekstraksi.



Gambar 13. Grafik *Main Effect Plot* untuk Titik Leleh

Dengan analisa BNJ (lampiran 4), didapatkan bahwa tidak terdapat interaksi antara dua faktor perlakuan. Akan tetapi, jenis asam dan lama perendaman berpengaruh sangat nyata terhadap titik leleh kolagen. Menurut Miles dan Bailey (2001), denaturasi kolagen yang terjadi selama proses pelelehan (*melting*) menyertakan pemecahan ikatan hidrogen dan penyusunan kembali

ikatan triple heliks menjadi susunan rantai acak. Burjanadze dan Kisiriya (1982) dalam Nomura *et al* (2000), menyatakan bahwa suhu denaturasi kolagen menurun seiring dengan menurunnya kandungan hidroksirolin dalam kolagen tersebut. Berarti semakin banyak hidroksirolin yang terkandung dalam kolagen, maka melting point akan semakin tinggi, begitu pula sebaliknya. Ditambahkan oleh Jongjareonrak *et al* (2005), bahwa tingginya suhu denaturasi kolagen dipengaruhi oleh tingginya kandungan asam amino. Fennema (1996) menyatakan adanya hubungan antara kandungan asam amino (hidroksirolin) dengan suhu leleh kolagen, yaitu semakin banyak kandungan asam amino kolagen suatu spesies maka semakin tinggi suhu melting kolagen tersebut. Titik leleh kolagen yang tinggi memiliki kualitas yang lebih baik dan juga lebih stabil dibandingkan kolagen yang memiliki titik leleh yang rendah, sehingga jika kolagen dipanaskan pada suhu diatas suhu titik leleh maka kolagen tersebut akan kehilangan aktivitasnya atau terdenaturasi (Anonymous, 2000).

Lama perendaman berpengaruh nyata terhadap titik leleh kolagen yang diekstraksi. Perlakuan dengan lama rendam 3 hari menghasilkan titik leleh terendah. Diduga hal ini disebabkan oleh sedikitnya kandungan prolin dan hidroksirolin kolagen yang dihasilkan sehingga menyebabkan penurunan titik leleh karena kurangnya ikatan hidrogen pada kolagen dalam larutan. Anonymous (2000) menjelaskan bahwa ikatan hidrogen merupakan penstabil rantai polipeptida yang berikatan *triplehelix*, kekurangstabilan ikatan akan menurunkan titik leleh kolagen.

Stabilnya ikatan molekul ini maksudnya tingginya jumlah dari prolin dan hidroksirolin yang dihasilkan sewaktu diekstrak dengan menggunakan konsentrasi asam asetat yang tinggi. Kandungan dari prolin dan hidroksirolin terhadap bahan yang digunakan memegang peranan yang sangat penting (Anonymous, 2007).

4.2.4 Suhu Denaturasi

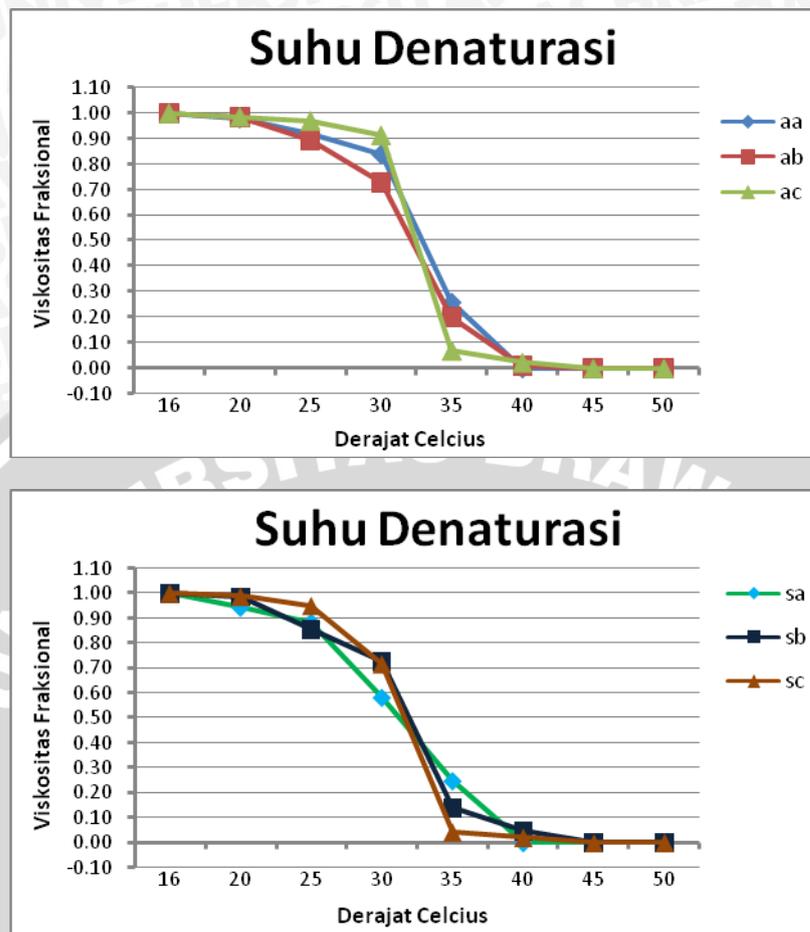
Tabel 6. Rerata Suhu Denaturasi Kolagen Sisik Ikan Kakap Merah

Perlakuan		Suhu Denaturasi (°C)
Jenis Asam	Lama Ekstraksi	
Asetat (A)	3 hari (a)	32,7 ± 0,216 ^a
Asetat (A)	5 hari (b)	32,0 ± 3,266 ^a
Asetat (A)	7 hari (c)	32,3 ± 1,708 ^a
Sitrat (S)	3 hari (a)	31,3 ± 2,217 ^a
Sitrat (S)	5 hari (b)	31,8 ± 1,500 ^a
Sitrat (S)	7 hari (c)	31,5 ± 1,291 ^a

*Ket : Data merupakan rerata dari 4 ulangan

Hasil dari analisa sidik ragam (lampiran 5), didapatkan bahwa perlakuan dengan penggunaan jenis asam dan lama perendaman yang berbeda tidak berpengaruh nyata ($P > 0.05$) terhadap suhu denaturasi kolagen sisik ikan yang dihasilkan. Berdasarkan hasil penelitian, rerata yield dari kolagen sisik ikan dapat dilihat pada Tabel 6 di atas.

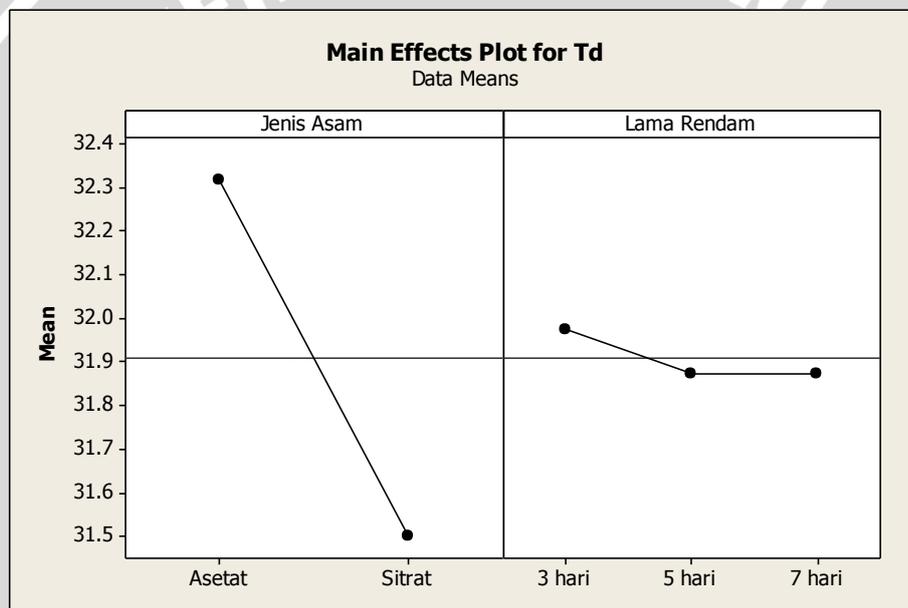
Nilai kisaran suhu denaturasi kolagen sisik ikan antara $31,3 \pm 2,217$ sampai $31,5 \pm 1,291$ °C untuk penggunaan pelarut asam asetat, dan berkisar antara $32,3 \pm 1,708$ sampai sampai $32,7 \pm 0,216$ °C dengan pelarut asam sitrat. Dalam hal ini, penggunaan asam sitrat dengan lama perendaman 3 hari merupakan perlakuan yang memiliki nilai suhu denaturasi tertinggi, sedangkan penggunaan pelarut asam asetat dengan lama perendaman 3 hari merupakan perlakuan yang memiliki nilai suhu denaturasi terendah. Namun dalam hal ini, pelarut dan lama perendaman tidak memberikan pengaruh yang nyata terhadap suhu denaturasi. Pengambilan suhu denaturasi didapat dari perubahan viskositas cairan terhadap suhu yang dapat dilihat pada gambar 14 dibawah ini.



Gambar 14. Viskositas Fraksional Kolagen

Suhu denaturasi didapat pada saat perubahan viskositas fraksional mencapai setengahnya (0.5). Usha dan Ramasami (2004) menyatakan bahwa viskositas fraksional dari larutan kolagen berubah dengan meningkatnya suhu yang diberikan karena ikatan struktur heliks kolagen menjadi terbentang sehingga menyebabkan kehilangan viskositas. Suhu denaturasi ini dapat digunakan sebagai suatu parameter untuk mengetahui bagaimana kualitas kolagen yang meliputi kemampuan kolagen untuk menjaga konformasi struktur pada suhu penyimpanan.

Dari grafik *main effect plot* suhu denaturasi pada gambar 19 di bawah ini, memang ada perbedaan antara penggunaan jenis asam dan lama perendaman. Namun, perbedaan tersebut tidak begitu nyata, sehingga dapat dikatakan perlakuan tersebut tidak berpengaruh terhadap suhu denaturasi kolagen. Hal ini dapat disebabkan karena kolagen dihasilkan dari spesies yang sama, sehingga menghasilkan kolagen dengan sifat yang sama. Kestabilan kolagen terhadap suhu dipengaruhi oleh banyaknya asam imino (Piez dan Gross, 1960), lingkungan tempat hidup ikan, serta suhu tubuh ikan (Rigby, 1968).



Gambar 15. Grafik *Main Effect Plot* Suhu denaturasi.

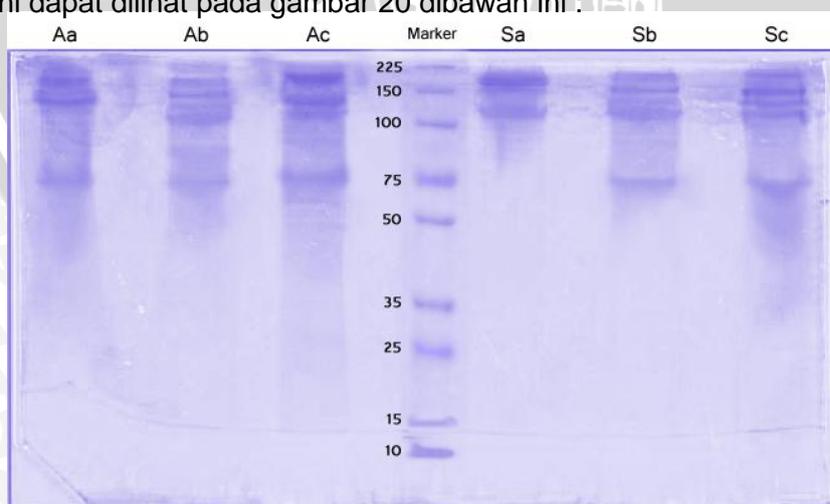
Dapat dilihat pada gambar 15 bahwa suhu denaturasi dengan pelarut asam asetat memberikan nilai lebih tinggi daripada menggunakan pelarut asam sitrat. Kejadian ini disebabkan karena asam asetat lebih efektif dalam mengekstrak kolagen dari sisik ikan, sehingga secara kualitas asam amino penyusunnya lebih baik dan menyebabkan kolagen lebih stabil. Stabilitasnya ikatan molekul ini maksudnya tingginya jumlah dari prolin dan hidrosiprolin yang dihasilkan sewaktu diekstrak dengan menggunakan konsentrasi asam asetat

yang tinggi. Kandungan dari prolin dan hidroksiprolin terhadap bahan yang digunakan memegang peranan yang sangat penting (Anonymous, 2007).

Jika diambil rerata, besar suhu denaturasi kolagen sisik ikan kakap merah sekitar 31,9 °C. Dibandingkan dengan suhu denaturasi kolagen sisik ikan dari spesies lain seperti sarden (28.5 °C), red sea bream (28 °C), dan bass jepang (28 °C) (Nagai *et.al*, 2004), Suhu denaturasi kolagen sisik ikan kakap merah lebih tinggi. Meskipun begitu, semua suhu denaturasi kolagen sisik ikan tersebut masih lebih rendah daripada kolagen dari kulit babi, yaitu 37 °C (Ikoma *et.al*, 2003) dan kolagen kulit sapi, yaitu 40,8 °C (Komsa-Penkova *et.al*, 1999), sehingga menunjukkan bahwa kolagen dari sisik ikan lebih kurang stabil dibanding kolagen hewan mamalia.

4.2.5 SDS-PAGE

Setelah dilakukan pengeringan kolagen dengan menggunakan freeze dryer, maka dilakukan analisa Gel Elektroforesis yang bertujuan untuk melihat pola pergerakan pita-pita protein penyusun kolagen sisik ikan. Pada analisa ini dilakukan dengan menggunakan 12,5% gel SDS-PAGE. Hasil dari analisa SDS-PAGE ini dapat dilihat pada gambar 20 dibawah ini :



Gambar 16. Pola Pergerakan Pita Protein Kolagen Sisik Ikan Kakap Merah

Dari gambar hasil analisa tersebut, terdapat beberapa pola pergerakan pita band protein yang sebagian besar sama pada penggunaan perlakuan yang berbeda. Pola migrasi dari penggunaan bahan ekstraksi dan lama perendaman relative tidak memberikan pengaruh yang nyata. Hasil pita pada gel elektroforesis di gambar 20, menunjukkan bahwa terbentuk beberapa pita yang menunjukkan adanya berbagai jenis asam amino yang dikandung di dalam kolagen sisik ikan kakap. Nomura *et al* (2000) menerangkan, jenis asam amino yang terkandung dalam serat kolagen dapat digunakan untuk mengetahui suhu stabilitas kolagen. Berat molekul pita setela di empiriskan dapat dilihat dalam tabel 7 dibawah ini.

Tabel 7. Berat Molekul Pita Protein Kolagen Sisik Ikan Kakap Merah (KDa)

BM	Asam Amino	Aa	Ab	Ac	Sa	Sb	Sc
177.51	Arginin			v		v	v
169.48	Hidroksilisin	v	v		v		
163.19	Phenilalanin				v		
150.02	Asam Glutamat	v	v		v	v	
132.24	Hidroksiprolin	v	v	v		v	v
116.57	Prolin	v	v	v	v	v	v
88.69	Alanin		v				
74.96	Glisin	v	v	v		v	v

Berdasarkan Tabel 7 diketahui bahwa seluruh perlakuan mengandung asam amino glisin, prolin dan hidroksiprolin. Selain itu terdapat asam amino arginin, hidroksilisin, phenilalanin, asam glutamate, dan alanin. Asam amino glisin, prolin dan hidroksi prolin dan hidroksi lisin memang wajar ditemukan pada kolagen, karena asam-asam amino tersebut merupakan pembentuk rangkaian triplehelix dari kolagen. Kolagen tersusun atas rangkaian Gly-X-Y yang berulang-ulang. Dimana Gly adalah glisin dan X merupakan prolin, sedangkan Y bisa asam amino yang lain. Komposisi asam amino pada protein kolagen antara lain: (1) *glisin*, (2) *prolin*, dan (3) turunan dari asam amino, seperti turunan prolin dan

lisin yaitu *hidroksiprolin* dan *hidroksilisin* (Anonymous, 2007^c). Hasil dari struktur tersebut disebut sebagai *collagen helix* atau rantai spiral kolagen (Harrison, 2005). Dapat dilihat bahwa asam amino phenylalanine hanya dapat diekstrak menggunakan sitrat selama 3 hari, hal ini karena sifatnya yang mudah menguap, sedangkan asam amino hidroksiprolin hanya dapat di ekstrak dengan sitrat pada hari kedua, sebab diduga karena asam tersebut sangat berikatan dengan jaringan kolagen. (Anonymous, 2007^c)

Hasil penelitian O'Driscall *et al.* (1985) bahwa gel SDSPAGE dapat digunakan untuk mengidentifikasi kolagen tipe I dan kolagen II. Berdasarkan pola dan jarak migrasinya, pita peptida (protein) untuk kolagen hasil ekstraksi dengan ke empat jenis larutan asam masing-masing diduga termasuk kolagen tipe I yang terdiri dari dua rantai peptide kembar yaitu rantai α_1 dan α_2 . Menurut Muyonga *et al* (2003), kolagen Tipe I merupakan kolagen yang paling dikenal, ditemukan di seluruh jaringan ikat, termasuk kulit dan tulang. Kolagen ini mengandung 1-3 glisin, tidak mengandung triptofan dan sistein, serta mengandung sedikit tiroksin dan histidin. Selain itu kolagen Tipe I tersusun atas rantai alfa, berdasarkan Gambar 8, juga diketahui terdapat pita dengan berat molekul di atas 116 kDa, dimana perkiraan standart berat molekul dari rantai alfa (α -chain) adalah ± 120 kDa.

Bailey dan Light (1989) menyatakan bahwa semua tipe kolagen yang terdapat dalam tubuh hewan terdiri dari tiga rantai polipeptida α (rantai α). Kolagen tipe I terdiri dari dua rantai α_1 dan satu rantai α_2 , sedangkan kolagen tipe II hanya terdiri tiga rantai peptide kembar yaitu α_1 . Teknik elektroforesis dapat digunakan untuk memisahkan dan mengidentifikasi rantai peptida α_1 dan α_2 yang terdapat pada kolagen baik tipe I maupun II. Kolagen II. Pada kolagen hasil ekstraksi dengan 5% larutan asam asetat, laktat dan sitrat setelah diidentifikasi dengan SDS-PAGE mempunyai berat molekul yang besar.

Li (1993) menyatakan bahwa semua tipe kolagen terdiri dari tiga rantai α dan β . Selanjutnya dinyatakan hasil elektroforesis ekstrak kolagen dari ekor tikus yang diekstraksi menggunakan larutan asam dapat memisahkan rantai α (rantai α_1 dan α_2) dan rantai β . Kolagen yang paling banyak dikenal orang adalah kolagen tipe I yang terdiri dari tiga rantai polipeptida.

Terlihat perbedaan berat molekul yang dipengaruhi oleh lama perendaman, dimana dengan lama rendam selama 5 hari memiliki pita protein dengan berat molekul terendah daripada 3 hari dan 7 hari perendaman. Diduga hal ini disebabkan pada lama perendaman 3 hari masih belum begitu banyak kolagen yang terekstraksi, sehingga masih sedikit band pita yang terlihat. Hal ini diperkuat dengan hasil yield yang dihasilkan. Sedangkan pada perendaman 7 hari, dihasilkan pita dengan berat molekul yang relatif lebih besar, sebab semakin lama ekstraksi, kolagen yang terdapat pada larutan saling membentuk ikatan agregat sehingga memiliki berat molekul yang lebih besar. Dengan menggunakan asam terbukti bahwa asam asetat lebih efektif dalam melarutkan kolagen, hal ini terlihat pada pita yang dihasilkan, dan diperkuat dengan hasil yield yang lebih besar.

4.2.6 Perlakuan Terbaik de Garmo

Dari hasil penelitian, dilakukan analisa de Garmo untuk mengetahui perlakuan terbaik selama proses ekstraksi. Dari perhitungan tersebut, maka dapat ditarik kesimpulan bahwa perlakuan perlakuan Ab (pelarut asam asetat dan lama rendam 5 hari) merupakan perlakuan yang terbaik. Perlakuan tersebut mempunyai yield sebesar 24.37 ± 0.451 %, kadar air 82.45 ± 0.0017 %, titik leleh 43.5 ± 0.58 °C, dan suhu denaturasi 32.0 ± 3.266 °C.

Memang pada kenyataannya perlakuan dengan lama perendaman dapat menghasilkan yield yang tertinggi, namun hasil tersebut tidak jauh berbeda dengan hasil ekstraksi selama 3 hari, sehingga penggunaan lama 7 hari merupakan suatu pemborosan. Selain itu, terbukti pada pita hasil SDS-PAGE bahwa protein dengan lama perendaman 7 hari sudah mengalami degradasi. Hal ini ditunjukkan dengan band pita yang hilang pada perlakuan lama ekstrak 7 hari.



5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian mengenai pengaruh jenis asam dan lama perendaman yang berbeda terhadap sifat fisikokimia hasil ekstraksi kolagen sisik ikan kakap merah (*Lutjanus sp.*), dapat disimpulkan bahwa perlakuan ekstraksi dengan menggunakan asam yang berbeda (asam asetat dan asam sitrat) dan lama perendaman (3, 5, dan 7 hari) memberikan pengaruh yang nyata terhadap yield, titik leleh, kadar air, dan hasil SDS-PAGE, tetapi tidak memberikan pengaruh nyata terhadap suhu denaturasi. Dengan perlakuan Ab merupakan perlakuan yang terbaik. Perlakuan tersebut mempunyai yield sebesar 24.37 ± 0.451 %, kadar air 82.45 ± 0.17 %, titik leleh 43.5 ± 0.58 °C, dan suhu denaturasi 32.0 ± 3.266 °C, dan memiliki asam amino penyusun dengan berat molekul 74,96 – 169,48 KDa.

5.2 Saran

Pada ekstraksi kolagen sisik ikan kakap merah yang telah dilakukan, maka disarankan :

1. Perlu adanya perlakuan penghancuran sisik ikan dan modifikasi proses ekstraksi secara enzimatik untuk menghasilkan yield yang lebih besar.
2. Perlu adanya karakterisasi kualitas kolagen sisik ikan kakap merah menggunakan foto *Scanning Electron Microscopy (SEM)* dan uji *Fourier Transform Infra-Red (FTIR)*

DAFTAR PUSTAKA

Anonymous, 2000. **Fish Gelatin and Collagen**. <http://www.norlandprod.com>. Diakses tanggal 24 Desember 2006.

_____, 2005. **Aplikasi Teknologi Pasca Panen Hasil Perikanan**. <http://www.cofish.net/uploaded/others/Aplikasi%20Teknologi%20PascaPanen%20.pdf>. Diakses tanggal 24 Desember 2006.

_____, 2007. **What is Collagen?**. <http://www.wisegeek.com/what-is-collagen.htm>. Diakses 17 Maret 2007.

_____, 2009. **Bovine Syndrom Enchelophaty**. http://en.wikipedia.org/bovine_syndrom_enchelophaty. Diakses pada tanggal 1 Desember 2009.

_____, 2009. **Citric Acid**. http://en.wikipedia.org/citric_acid. diakses pada tanggal 28 November 2009.

_____, 2009. **Foot and Mouth Disease**. http://en.wikipedia.org/foot_and_mouth_disease. Diakses pada tanggal 1 Desember 2009.

_____. 2005c. **Collagen**. The Columbia Encyclopedia, Sixth Edition. Columbia University Press. <http://www.bartleby.com/65/co/collagen.html>. Diakses tanggal 17 Maret 2007.

_____. 2006b. **Collagen**. <http://www.snowdriftfarm.com>. Diakses 16 Maret 2007.

_____. 2007c. **Collagen**. <http://en.wikipedia.org/wiki/Collagen>. Diakses tanggal 16 Maret 2007.

_____. 2007d. **Collagen**. <http://www.worthington-biochem.com/CL/default.html>. Diakses 17 Maret 2007.

Apriyantono, A., D. Fardiaz, N.L. Puspitasari, Sedarnawati, dan S. Budiyo. 1989. **Petunjuk Laboratorium Analisis Pangan**. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi. Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi. Institut Pertanian Bogor. Bogor.

Asikin 1985. **Budidaya Ikan Kakap**. Penebar Swadaya. Jakarta.

- Atkins, P. W. 1992. **Physical Chemistry**. Fourth Edition. Oxford University Press. Oxford.
- Bernasconi, G., H. Gerster, H. Hauser, H. Stauble, and E. Scheneifer. 1995. **Teknologi Kimia. Bagian 2**. Penerjemah : Handjojo L dan Pradnya Paramita. Jakarta.
- Cheng, Fu-Yuan., Feng-Wen Hsu, His-Shan Chang, Liang-Chuan Lin, Ryoichi Sakata. 2009. **Effect Of Different Acids On The Extraction Of Pepsin-Solubilised Collagen Containing Melanin From Silky Fowl Feet**. Journal of Food chemistry. 113 (2009) 563-567.
- Cheung, H., Robin S.T., dan G. Paul T. 2005. **Acetic Acid**. Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA. Weinheim.
- Christner, P.J, J. Gentiletti, J. Peters, S.T Ball, M. Yamauchi, P. Atsawasuwan, D.P. Beason, L.J Soslowsky, dan D.E Birk. 2006. **Collagen Dysregulation in the Dermis of the Sagg/+ Mouse: A loose Skin Model**. The Society for Investigative Dermatology. Philadelphia. 126: 595-602.
- Damodaran, S. dan A. Paraf. 1997. **Food Protein and Their Applications**. Marcel Dekker. Inc. New York.
- Diaz, M.D Fernandez, P. Montero, M.C Gomez-Guillen. 2001. **Gel Properties of Cod (*Gardus morhua*) and Hake (*Merluccius merluccius*) and their modification by Coehancers Magnesium Sulphate, Glycerol, and Transglutaminase**. Journal of Food Chemistry 74 (2001) 161-167.
- Elliot, J. 2001. **Fish Scale Chemistry**. http://newton.anl.dep.gov/fish_scale. Diakses pada tanggal 7 Agustus 2009.
- Fennema, O.R. 1996. **Food Chemistry, third edition**. Marcel Dekker Inc. New York.
- Franks, Felix. 1993. **Protein Biotechnology: Isolation, Characterization and Stabilization**. Humana Press. New Jersey. 592 hal.
- Friess, Wolfgang. 1997. **Collagen, Biomaterial for Drugs Delivery**. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 45 (1998) 113–136
- Gómez-Guillén, M. C., dan Montero, P. (2001). **Extraction Of Gelatin From Megrim (*Lepidorhombus Boscii*) Skins With Several Organic Acids**. Journal of Food Science, 66, 213–216.
- Gross, J., J.H. Highberger dan F.O. Schmitt. 1954. **Extraction of Collagen from Connective Tissue by Neutral Salt Solutions**. Proceeding of The National Academy of Sciences. 41: 1-7.

- Harrison, Karl. 2005. **Collagen**. <http://www.3dchem.com/motm.asp>. Diakses tanggal 16 Maret 2007.
- Hsiao, Chin Ying, Chiang Hung Chou, His Wen Sun, June Nam Seah, 2008. **Collagen Production Method**. United State Patent. USA.
- Ikoma, T., H. Kobayasi, J. Tanaka, D. Wals, dan S. Mann. 2003. **Physical Properties of Type I Collagen Extracted from Fish Scale of *Pagrus major* and *Oreochromis Niloticas***. Int. J. Biol. Macromol. 32, 199-204.
- Jongjareonrak, A., S. Benjakul, W. Visessanguan, T. Nagai, dan M. Tanaka. 2004. **Isolation and Characterisation of Acid and Pepsin-Solubilised Collagens from The Skin of Brownstripe Red Snapper (*Lutjanus vitta*)**. Elsevier. 93: 475-484.
- Junianto. 2003. **Teknik Penanganan Ikan**. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Kimura, S., Y. Miyauchi, dan N. Uchida. 1991. **Scale and Bone Type I Collagens of Carp (*Cyprinus carpio*)**. Comparative Biochemistry and Physiology, 99B, 473-476.
- Komsa-Penkova, R., R. Koynova, G. Kostov dan B. Tenchov. 1999. **Discrete Reduction of Type I Collagen Thermal Stability Upon Oxidation**. Biophys. Chem. 83. 185-195.
- Li, Shu-Tung, 1993. **Collagen Biotechnology And Its Medical Application**. *Biomed. Eng. ppl. Baia Comm.* 5 :646-657.
- Liu, D.C., Y.K. Lin dan M.T. Chen. 2001. **Optimum Condition of Extracting from Chicken Feet and Its Characteristics**. Departemen of Animal Science, National
- Liu, W., G. Li, Y. Miao, dan X. Wu. 2007. **Preparation and Characterization of Pepsin-Soluble Type I Collagen from The Scales of Snakehead (*Ophiocephalus argus*)**. Journal of Food biochemistry 33 (2009) 20-37.
- Martin, D.W., P.A. Mayes., V.W. Rodwel dan D.K. Granner, 1987. **Biokimia**. Alih Bahasa Darmawan. CV. EGC Penerbit Buku Kedokteran. Jakarta
- Martin, RB. 1998. **Free energies and equilibria of peptide bond hydrolysis and formation**. Journal of Biopolymer. 45. 351-353.
- Mathews, C. K., K. E Holde dan K. G Ahern. 2000. **Biochemistry 3rd**. Addison-Wesley Publishing Company. New York.
- Miles, A.C, A.J. Bailey. 2001. **Thermally Labile Domains in The Collagen Molecule**. Collagen Research Group, Division of Molecular and Cellular Biology, University of Bristol Langford, Bristol. Elsevier. 32: 325-332.

- Morimura, S., H. Nagata, Y. Uemura, A. Fahmi, T. Shigematsu, dan K. Kida. 2001. **Development Of An Effective Process For Utilization Of Collagen From Livestock And Fish Waste**. *Process Biochemistry* 37 (2002) 1403–1412.
- Muyonga, J.H., C.G.B. Cole dan K.G. Duodu. 2003. **Characterisation of Acid Soluble Collagen from Skins of Young and adult Nile Perch (*Lates niloticus*)**. *Elsevier Food Chemistry*. 85: 81-89.
- Nagai, Takeshi., Masami Izumi, Masahide Ishii. 2004. **Fish Scale Collagen : Preparation and Partial Charaterization**. *International Journal of food Science and Technology* 2004, 39, 239-244.
- Nazir, M. 1999. **Metode Penelitian**. Penerbit Ghalia Indonesia. Jakarta.
- Nomura, Y., H. Sakai, Y. Ishii, dan K. Shirai. 1996. **Preparation and Some Properties of Type I Collagen from Fish Scale**. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 60, 219, 166-167.
- O'Driscall, S.W., R.B. Salter, and F.W. Keeley, 1985. **A Method For Quantitative Analysis Of Ratio Of Type I And Ii Collagen In Small Samples Of Articular Cartilage**. *Analytical Biochemistry*. 145 : 277-285.
- Ogawa, M., Ralph J. Portier, Michael M. Moody, Jon Bell, Mark A. Schenayder, Jack N. Losso, 2004. **Biochemical Properties of Bone and Scale Collagens Isolated From Subtropical fish Black Drum (*Pogonia cromis*) and Sheepshead Seabream (*Archosargus probatocephalus*)**. *Journal Food Chemistry* 88 (2004), 495-501.
- Pelt-Heerschap, H.V., M.J.J. Kotterman, N. Shaw dan J.W. van de Vis. 2005. **Extraction and Characterization of Collagen from Skin and Bones of Cod (*Gadus morhua*)**. The Netherlands Institute for Fisheries Research (RIVO).
- Piez, K.A. dan Gross, J. 1960. **The Amino Acid Composition of some Fish Collagen: The Relation Between Composition an Structure**. *Journal of BioChemistry*. 235(4), 995-998.
- Prayitno, 2006. **Ekstraksi Kolagen Cakar Ayam dengan Berbagai Jenis Larutan Asam dan Lama Perendamannya**. *Animal Production*. Volume 9 No 2.
- Purseglove, J.W., E.G Brown., C.L Green and S.R.J Robbin. 1981. **Spices**. Longman Singapore Publ. Singapore.

- Rehn, M., Veikkola, T., Kukk-Valdre, E., Nakamura, H., Ilmonen, M., Lombardo, C., Pihlajaniemi, T., Alitalo, K., dan Vuori, K. 2001. **Interaction Of Endostatin With Integrins Implicated In Angiogenesis**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 98, 1024–1029.
- Rigby, B. J. 1968. **Amino Acid Composition and Thermal Stability of The Skin Collagen of the Antarctic Ice-Fish**. Nature. 219, 166-167.
- Rook, A., D.S. Wilkinson dan F.J.G. Ebling. 1979. **Textbook of Dermatology, 3rd edition. Vol 2**. Blackwell Scientific Publications. Oxford.
- Singarimbun, M. dan Effendi, S. 1987. **Metode Penelitian Survei**. Edisi Revisi. LP3ES. Jakarta.
- Skierka, E, dan M. Sadowska. 2007. **The Influence of Different Acid and Pepsin on The Extractibility of Collagen from Skin of Baltic Cod (*Gadus Morhua*)**. Food Chemistry. Elsevier Ltd.
- Sudarmadji, S., B. Haryono dan Suhardi. 2003. **Prosedur Analisa Untuk Bahan Makanan dan pertanian**. Liberty. Yogyakarta. 172 hal.
- Surachmad, W. 1994. **Dasar Metode Teknik Pengantar Penelitian Ilmiah**. Tarsito. Bandung.
- Susanto, W.H. 1999. **Teknologi Lemak dan Minyak Makan**. Jurusan THP Fakultas Teknologi Pertanian. Universitas Brawijaya. Malang.
- Toha, A.H.A. 2001. **Biokimia: Metabolisme Biomolekul**. Alfabeta. Bandung
- Trevitt, C. R., & Singh, P. N. 2003. **Variant Creutzfeldt-Jakob disease: Pathology, epidemiology, and public health implications**. American Journal of Clinical Nutrition, 78, 651S–656S.
- Usha, R. dan Ramasami, T. 2004. **The Effect of Urea and n-Propanol on Collagen Denaturation: Using DSC, Circular Dichroism, and Viscosity**. Thermochim. Acta 409, 201-206.
- Voight, R. 1995. **Buku Pelajaran Teknologi Farmasi**. Penerjemah Soendani, N.S. Gajamada University Pres. Yogyakarta
- Wang, Lingzhao., Bao Yang, Rui Wang, Xiuqiao Du. 2007. **Extraction of Pepsin-Soluble Collagen from Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella*) Skin Using an Artificial Neural Network**. Journal of Food Chemistry 111 (2008) 683-686.
- Woo, J.W., S.J. Yu, S.M Cho, Y.B Lee dan S.B. Kim. 2007. **Extraction Optimization and Properties of Collagen from Yellowfin Tuna (*Thunnus albacores*) Dorsal Skin**. Elsevier Ltd.

- Yunoki, S., T. Suzuki, dan M. Takai. 2003. **Stabilization of Low Denaturation Temperature Collagen from Fish by Physical Cross-Linking Methods**. Journal of Bioscience and Bioengineering. Vol. 96, No. 6, 575-577.
- Yuwono, S dan T. Susanto. 1998. **Pengujian Fisik Pangan**. Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Brawijaya. Malang
- Zanaboni, G., A. Rossi, A.M.T. Onana, dan R. Tenni. 2000. **Stability and Network of Hydrogen Bonds of The Collagen Triple Helical Structure: Influence of pH and Chaotropic Nature of Three Anions**. Elsevier. 12: 511-520.
- Zayas, J.F. 1997. **Functionality of Proteins in Food**. Springer. Jerman.
- Zelechowska, E., M. Sadowska, Magdalena Turk. 2009. **Isolation and Some Properties of Collagen from the Backbone of Baltic Cod (Gardus Marhua)**. Journal of Food Hydrocolloids (2009), doi: 10.1016
- Zhao, Boyang. 2006. **Collagen**. <http://www.directscience.info/biology/collagen>. Diakses tanggal 16 Maret 2007.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Uji Normalitas Data

```
DATASET ACTIVATE DataSet3.
DESCRIPTIVES VARIABLES=yield air melting denaturasi
  /STATISTICS=MEAN STDDEV MIN MAX KURTOSIS SKEWNESS.
```

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
yield	24	15.7408	7.93485	4.02	25.22
air	24	84.1425	2.42695	81.10	88.87
melting	24	42.3750	2.24214	38.00	46.00
denaturasi	24	31.9083	1.78031	28.00	36.00

Descriptive Statistics

	Std. Deviation	Skewness		Kurtosis	
	Statistic	Statistic	Std. Error	Statistic	Std. Error
yield	7.93485	-.111	.472	-.988	.918
air	2.42695	.717	.472	-.691	.918
melting	2.24214	-.389	.472	-.961	.918
denaturasi	1.78031	-.162	.472	.419	.918
Valid N (listwise)					

----> +1 > Skewness > -1 = distribusi data normal *)

```
NPAR TESTS
  /K-S(NORMAL)=yield air melting denaturasi
  /STATISTICS DESCRIPTIVES
  /MISSING ANALYSIS.
```

NPar Tests

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		yield	air	melting	denaturasi
N		24	24	24	24
Normal Parameters ^a	Mean	15.7408	84.1425	42.3750	31.9083
	Std. Deviation	7.93485	2.42695	2.24214	1.78031
Most Extreme Differences	Absolute	.182	.229	.193	.187
	Positive	.181	.229	.147	.145
	Negative	-.182	-.116	-.193	-.187
Kolmogorov-Smirnov Z		.892	1.124	.946	.917
Asymp. Sig. (2-tailed)		.404	.160	.332	.370

a. Test distribution is Normal.

----> Asymp. Sig. (2-tailed) > (p=0.05) = distribusi data normal *)
 ----> Kolmogorov-Smirnov Z < 1.97 = distribusi data normal **)

Lampiran 2. Analisa Data Yield Kolagen Sisik Ikan Kakap Merah

➤ Data :

Perlakuan	Yield (%)				Rerata	SD
Aa	9.47	9.02	9.63	9.37	9.37	0.25
Ab	24.70	24.05	23.92	24.81	24.37	0.45
Ac	25.22	25.01	25.13	25.03	25.10	0.09
Sa	4.22	4.02	4.68	4.36	4.32	0.27
Sb	11.65	12.01	11.8	11.96	11.85	0.16
Sc	19.58	19.64	19.21	19.29	19.43	0.21

➤ Analisa Sidik Ragam (ANOVA)

Factor	Type	Levels	Values
Jenis Asam	fixed	2	Asetat, Sitrat
Lama Rendam	fixed	3	3 hari, 5 hari, 7 hari

Analysis of Variance for Yield, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Jenis Asam	1	359.88	359.88	359.88	5041.21	0.000
Lama Rendam	2	1018.20	1018.20	509.10	7131.49	0.000
Jenis Asam*Lama Rendam	2	68.69	68.69	34.34	481.09	0.000
Error	18	1.28	1.28	0.07		
Total	23	1448.05				

S = 0.267184 R-Sq = 99.91% R-Sq(adj) = 99.89%

➤ Uji Beda Nyata Jujur (BNJ)

Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals
All Pairwise Comparisons among Levels of Lama Rendam

Individual confidence level = 98.00%

Lama Rendam = 3 hari subtracted from:

Lama Rendam	Lower	Center	Upper	
5 hari	5.571	11.266	16.960	(-----*-----)
7 hari	9.722	15.417	21.111	(-----*-----)

-8.0 0.0 8.0 16.0

Lama Rendam = 5 hari subtracted from:

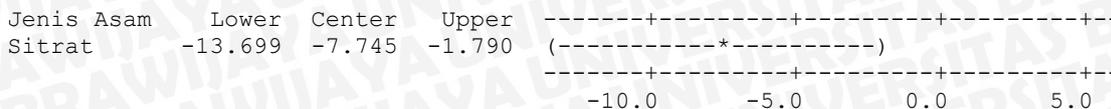
Lama Rendam	Lower	Center	Upper	
7 hari	-1.543	4.151	9.845	(-----*-----)

-8.0 0.0 8.0 16.0

Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals
All Pairwise Comparisons among Levels of Jenis Asam

Individual confidence level = 95.00%

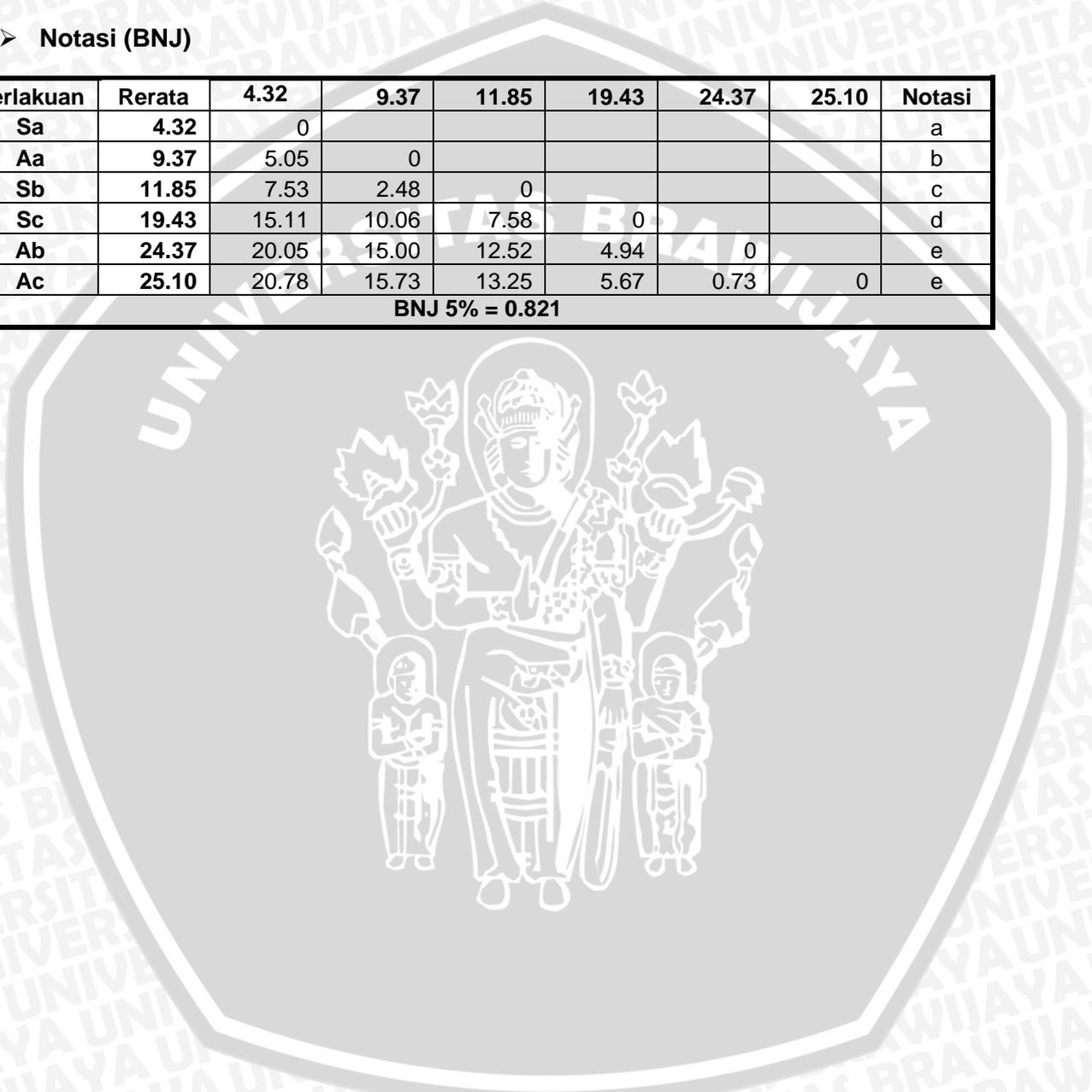
Jenis Asam = Asetat subtracted from:



➤ Notasi (BNJ)

Perlakuan	Rerata	4.32	9.37	11.85	19.43	24.37	25.10	Notasi
Sa	4.32	0						a
Aa	9.37	5.05	0					b
Sb	11.85	7.53	2.48	0				c
Sc	19.43	15.11	10.06	7.58	0			d
Ab	24.37	20.05	15.00	12.52	4.94	0		e
Ac	25.10	20.78	15.73	13.25	5.67	0.73	0	e

BNJ 5% = 0.821



Lampiran 3. Analisa Data Kadar Air Kolagen Sisik Ikan Kakap Merah

➤ **Data :**

Perlakuan	Kadar Air (%)				Rerata	SD
Aa	88.43	88.29	88.87	88.12	88.43	0.32
Ab	84.76	84.09	84.54	84.23	84.41	0.30
Ac	82.66	82.01	82.32	82.56	82.39	0.29
Sa	85.69	85.71	85.43	85.81	85.66	0.16
Sb	82.21	82.56	82.43	82.60	82.45	0.18
Sc	81.90	81.10	81.43	81.67	81.53	0.34

➤ **Analisa Sidik Ragam (ANOVA)**

```
Factor      Type      Levels  Values
Jenis Asam  fixed      2      Asetat, Sitrat
Lama Rendam fixed      3      3 hari, 5 hari, 7 hari
```

Analysis of Variance for Kadar Air, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Jenis Asam	1	20.795	20.795	20.795	275.80	0.000
Lama Rendam	2	109.665	109.665	54.833	727.25	0.000
Jenis Asam*Lama Rendam	2	3.655	3.655	1.828	24.24	0.000
Error	18	1.357	1.357	0.075		
Total	23	135.472				

S = 0.274586 R-Sq = 99.00% R-Sq(adj) = 98.72%

➤ **Uji Beda Nyata Jujur (BNJ)**

Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals
All Pairwise Comparisons among Levels of Lama Rendam

Individual confidence level = 98.00%

Lama Rendam = 3 hari subtracted from:

Lama Rendam	Lower	Center	Upper	
5 hari	-5.012	-3.616	-2.221	(-----*-----)
7 hari	-6.483	-5.088	-3.692	(-----*-----)

-----+-----+-----+-----+-----
-5.0 -2.5 0.0 2.5

Lama Rendam = 5 hari subtracted from:

Lama Rendam	Lower	Center	Upper	
7 hari	-2.867	-1.471	-0.076	(-----*-----)

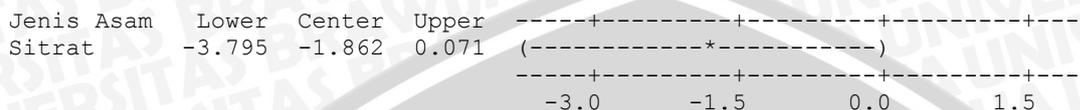
-----+-----+-----+-----+-----
-5.0 -2.5 0.0 2.5



Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals
 All Pairwise Comparisons among Levels of Jenis Asam

Individual confidence level = 95.00%

Jenis Asam = Asetat subtracted from:



➤ Notasi (BNJ)

Perlakuan	Rerata	81.53	82.39	82.45	84.41	85.66	88.43	Notasi
Sc	81.53	0						a
Ac	82.39	0.86	0					b
Sb	82.45	0.92	0.06	0				b
Ab	84.41	2.88	2.02	1.96	0			c
Sa	85.66	4.13	3.27	3.21	1.25	0		d
Aa	88.43	6.90	6.04	5.98	4.02	2.77	0	e

BNJ 5% = 0.147



Lampiran 4. Analisa Data Titik Leleh Kolagen Sisik Ikan Kakap Merah

➤ Data :

Perlakuan	Titik Leleh (°C)				Rerata	SD
Aa	41	40	40	40	40.25	0.50
Ab	44	43	44	43	43.5	0.58
Ac	45	46	44	45	45	0.82
Sa	38	39	39	40	39	0.82
Sb	42	43	43	42	42.5	0.58
Sc	44	44	45	43	44	0.82

➤ Analisa Sidik Ragam (ANOVA)

Factor	Type	Levels	Values
Jenis Asam	fixed	2	Asetat, Sitrat
Lama Rendam	fixed	3	3 hari, 5 hari, 7 hari

Analysis of Variance for Celcius, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Jenis Asam	1	7.042	7.042	7.042	14.49	0.001
Lama Rendam	2	99.750	99.750	49.875	102.60	0.000
Jenis Asam*Lama Rendam	2	0.083	0.083	0.042	0.09	0.918
Error	18	8.750	8.750	0.486		
Total	23	115.625				

S = 0.697217 R-Sq = 92.43% R-Sq(adj) = 90.33%

➤ Uji Beda Nyata Jujur (BNJ)

Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals
All Pairwise Comparisons among Levels of Lama Rendam

Individual confidence level = 98.00%

Lama Rendam = 3 hari subtracted from:

Lama Rendam	Lower	Center	Upper
5 hari	2.2807	3.3750	4.4693
7 hari	3.7807	4.8750	5.9693

-----+-----+-----+-----+-----
 (----*----)
 (----*----)
 -----+-----+-----+-----+-----
 -2.5 0.0 2.5 5.0

Lama Rendam = 5 hari subtracted from:

Lama Rendam	Lower	Center	Upper
7 hari	0.4057	1.5000	2.5943

-----+-----+-----+-----+-----
 (---*---)
 -----+-----+-----+-----+-----
 -2.5 0.0 2.5 5.0

Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals
 All Pairwise Comparisons among Levels of Jenis Asam

Individual confidence level = 95.00%

Jenis Asam = Asetat subtracted from:



➤ **Notasi (BNJ)**

Perlakuan	Rerata	39	40.25	42.5	43.5	44	45	Notasi
sa	39	0						a
aa	40.25	1.25	0					a
sb	42.5	3.5	2.25	0				b
ab	43.5	4.5	3.25	1	0			bc
sc	44	5	3.75	1.5	0.5	0		bc
ac	45	6	4.75	2.5	1.5	1	0	c

BNJ 5% = 1.5653



Lampiran 5. Analisa Data Suhu Denaturasi Kolagen Sisik Ikan Kakap Merah

➤ **Data :**

Perlakuan	Suhu Denaturasi (°C)				Rerata	SD
Aa	32.5	33	32.6	32.7	32.7	0.22
Ab	32	36	28	32	32.0	3.27
Ac	34	33	32	30	32.3	1.71
Sa	32	29	30	34	31.3	2.22
Sb	33	31	33	30	31.8	1.50
Sc	32	33	31	30	31.5	1.29

➤ **Analisa Sidik Ragam (ANOVA)**

Factor	Type	Levels	Values
Jenis Asam	fixed	2	Asetat, Sitrat
Lama Rendam	fixed	3	3 hari, 5 hari, 7 hari

Analysis of Variance for Td, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Jenis Asam	1	4.002	4.002	4.002	1.07	0.315
Lama Rendam	2	0.053	0.053	0.027	0.01	0.993
Jenis Asam*Lama Rendam	2	1.453	1.453	0.727	0.19	0.825
Error	18	67.390	67.390	3.744		
Total	23	72.898				

S = 1.93491 R-Sq = 7.56% R-Sq(adj) = 0.00%

➤ **Uji Beda Nyata Jujur (BNJ)**

Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals
All Pairwise Comparisons among Levels of Lama Rendam

Individual confidence level = 98.00%

Lama Rendam = 3 hari subtracted from:

Lama Rendam	Lower	Center	Upper	
5 hari	-2.444	-0.100	2.244	(-----*-----)
7 hari	-2.444	-0.100	2.244	(-----*-----)

-2.4 -1.2 0.0 1.2

Lama Rendam = 5 hari subtracted from:

Lama Rendam	Lower	Center	Upper	
7 hari	-2.344	0.000	2.344	(-----*-----)

-2.4 -1.2 0.0 1.2



Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals
All Pairwise Comparisons among Levels of Jenis Asam

Individual confidence level = 95.00%

Jenis Asam = Asetat subtracted from:

Jenis Asam	Lower	Center	Upper
Sitrat	-0.00071	0.01862	0.03795

Jenis Asam	-----+-----+-----+-----+-----
Sitrat	(-----*-----)
	-----+-----+-----+-----+-----
	-0.015 0.000 0.015 0.030

➤ Notasi (BNJ)

Perlakuan	Rerata	31.25	31.5	31.75	32	32.25	32.7	Notasi
sa	31.25	0						a
sc	31.5	0.25	0					a
sb	31.75	0.5	0.25	0				a
ab	32	1	0.75	0.5	0			a
ac	32.25	0.75	0.5	0.25	0.25	0		a
aa	32.7	1.45	1.2	0.95	0.7	0.45	0	a

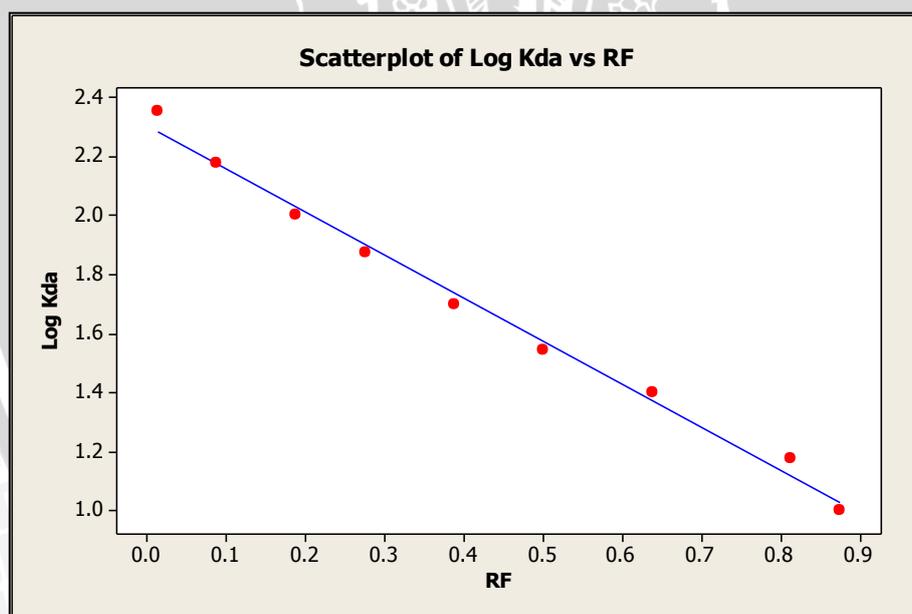
BNJ 5% = 4.3439

Lampiran 6. Perhitungan SDS-PAGE

Marker

Max track : 8 cm

BM (Kda)	Tracking (cm)	RF	Log Kda
225	0.10	0.013	2.3522
150	0.70	0.088	2.1761
100	1.50	0.188	2.0000
75	2.20	0.275	1.8751
50	3.10	0.388	1.6990
35	4.00	0.500	1.5441
25	5.10	0.638	1.3979
15	6.50	0.813	1.1761
10	7.00	0.875	1.0000



Persamaan Linear garis : $\text{Log Kda} = 2.304 - 1.461 \text{ RF}$



AA

Max track : 8

Band	Tracking	RF	Log Kda	AntLog Kda (BM)
1	0.41	0.051	2.2291	169.48
2	0.70	0.088	2.1762	150.02
3	1.00	0.125	2.1214	132.24
4	1.30	0.163	2.0666	116.57
5	2.35	0.294	1.8748	74.96

AB

Max track : 8

Band	Tracking	RF	Log Kda	AntLog Kda (BM)
1	0.41	0.051	2.2291	169.48
2	0.70	0.088	2.1762	150.02
3	1.00	0.125	2.1214	132.24
4	1.30	0.163	2.0666	116.57
5	1.95	0.244	1.9479	88.69
6	2.35	0.294	1.8748	74.96

AC

Max track : 8

Band	Tracking	RF	Log Kda	AntLog Kda (BM)
1	0.30	0.038	2.2492	177.51
2	1.00	0.125	2.1214	132.24
3	1.30	0.163	2.0666	116.57
4	1.95	0.244	1.9479	88.69
5	2.35	0.294	1.8748	74.96

SA

Max track : 8

Band	Tracking	RF	Log Kda	AntLog Kda (BM)
1	0.41	0.051	2.2291	169.48
2	0.50	0.063	2.2127	163.19
3	0.70	0.088	2.1762	150.02
4	1.30	0.163	2.0666	116.57

SB

Max track : 8

Band	Tracking	RF	Log Kda	AntLog Kda (BM)
1	0.30	0.038	2.2492	177.51
2	0.70	0.088	2.1762	150.02
3	1.00	0.125	2.1214	132.24
4	1.30	0.163	2.0666	116.57
5	2.35	0.294	1.8748	74.96

SC

Max track : 8

Band	Tracking	RF	Log Kda	AntLog Kda (BM)
1	0.30	0.038	2.2492	177.51
2	1.00	0.125	2.1214	132.24
3	1.30	0.163	2.0666	116.57
4	2.35	0.294	1.8748	74.96



Lampiran 7. Perhitungan perlakuan terbaik de Garmo

Parameter	Yield			Melting Point			Kadar air			Suhu denaturasi			SDS-PAGE			Total
	BV	1		BV	0.5		BV	0.2		BV	0.4		BV	0.7		
	BN	0.36		BN	0.18		BN	0.07		BN	0.14		BN	0.25		
	Nilai	NE	NP	Nilai	NE	NP	Nilai	NE	NP	Nilai	NE	NP	Nilai	NE	NP	
Aa	9.37	0.2432	0.09	40.25	0.2083	0.04	0.8566	0.4009	0.03	32.70	1.0000	0.14	5	0.50	0.13	0.42
Ab	24.37	0.9651	0.34	43.50	0.7500	0.13	0.8245	0.8660	0.06	32.00	0.5172	0.07	6	1.00	0.25	0.86
Ac	25.10	1.0000	0.36	45.00	1.0000	0.18	0.8153	1.0000	0.07	32.25	0.6897	0.10	5	0.50	0.13	0.83
Sa	4.32	0.0000	0.00	39.00	0.0000	0.00	0.8843	0.0000	0.00	31.25	0.0000	0.00	4	0.00	0.00	0.00
Sb	11.85	0.3626	0.13	42.50	0.5833	0.10	0.8441	0.5828	0.04	31.75	0.3448	0.05	5	0.50	0.13	0.45
Sc	19.43	0.7273	0.26	44.00	0.8333	0.15	0.8239	0.8750	0.06	31.50	0.1724	0.02	4	0.00	0.00	0.50

Lampiran 8. Prosedur Analisa Parameter Uji

a. Yield

Yield adalah persentase berat akhir yang dimiliki oleh suatu produk setelah mengalami proses pengolahan. Yield dapat dihitung sebagai berikut :

$$\text{Yield} = \frac{\text{Berat akhir}}{\text{Berat awal}} \times 100\%$$

b. Kadar Air

Penentuan kadar air dilakukan dengan menggunakan metode pengeringan (*Thermogravimetri*). Prinsipnya menguapkan air yang ada dalam bahan dengan jalan pemanasan. Kemudian menimbang bahan sampel berat konstan yang berarti semua air sudah diuapkan (Sudarmadji *et al*, 2003). Metode ini digunakan untuk seluruh produk makanan, kecuali jika produk tersebut mengandung komponen-komponen yang mudah menguap atau jika produk tersebut mengalami dekomposisi pada pemanasan 100°C (Apriyantono, *et al*, 1989).

Menurut Sudarmadji, *et al* (1996) penentuan kadar air dengan menggunakan metode *Thermogravimetri* dapat dilakukan sebagai berikut :

1. Botol timbang dan tutup dibersihkan kemudian dikeringkan dalam oven selama semalam pada suhu 105°C dengan tutup setengah terbuka.
2. Botol timbang dimasukkan ke dalam desikator selama 15-30 menit kemudian ditimbang beratnya.
3. Sampel sebanyak 2 gram dimasukkan ke dalam botol timbang kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C selama 3-5 jam dengan tutup setengah terbuka.

4. Botol timbang dikeluarkan dari oven lalu dimasukkan ke desikator selama 15-30 menit.
5. Ditimbang sampai berat konstan (selisih penimbangan berturut-turut < 0,2 mg).

Pengurangan berat merupakan banyaknya air dalam bahan, kadar air suatu bahan dapat diperoleh dengan menggunakan perhitungan sebagai berikut:

$$\text{wet bases (w b)} = \frac{(\text{berat botol timbang} + \text{berat sampel}) - \text{berat akhir}}{\text{berat sampel}} \times 100\%$$

$$\text{dry bases (db)} = \frac{(\text{berat botol timbang} + \text{berat sampel}) - \text{berat akhir}}{\text{berat akhir} - \text{berat botol timbang}} \times 100\%$$

c. Titik Leleh

Titik leleh (T_f) adalah suhu ketika cairan dan padatan berdampingan dalam keseimbangan saat tekanan atmosfer sebesar 1 atm, sedangkan saat tekanan sebesar 1 bar disebut dengan titik leleh standart (Atkins, 1992). Titik leleh biasanya diukur dengan thermometer atau thermocouple.

Penentuan titik leleh dapat dilakukan dengan metode secara objektif. Yaitu dengan bantuan alat *Thermocouple* (Gambar 14). Prosedur kerja dari perhitungan titik leleh dari penelitian ini dapat dijelaskan sebagai berikut :

- dimasukkan sampel ke dalam tabung reaksi sebanyak 2 gram
- dimasukkan ujung kabel dari alat thermocouple ke dalam sampel pada tabung reaksi
- dicelupkan pangkal tabung reaksi ke dalam waterbath yang telah dipanaskan dalam suhu tertentu (kisaran suhu 30°C-50°C)
- diperhatikan saat melelehnya sample dan dicatat suhu yang ditunjukkan oleh thermocouple pada saat kolagen meleleh.

d. Suhu denaturasi (T_d)

Suhu denaturasi (T_d) diukur dengan metode dari Nagai *et.al.* (2002). 5 mililiter dari sampel kolagen dengan konsentrasi 0.03 % dalam larutan 0.1 asam asetat digunakan untuk mengukur viskositas. Suhu denaturasi adalah suhu dimana perubahan dari viskositas, mulai setengah mengalami perubahan.

Pengukuran viskositas berdasarkan viskositas relatif menurut Yuwono dan Tri (2001) serta modifikasi oleh Liu *et.al.* (2007), yaitu :

- Siapkan pipet volume 25 ml dan beri tanda batas pada 10 cm 2 titik pipet.
- Hisap air dengan pipet tersebut sampai melebihi batas tanda yang telah dibuat
- Atur dengan menggunakan jari agar permukaan air tepat pada batas tanda bagian atas pipet yang telah dibuat.
- Dengan menggunakan stopwatch lepaskan jari penutup lubang pipet bersamaan dengan stopwatch on
- Ketika permukaan air tepat pada tanda batas bawah, hentikan stopwatch
- Catat waktu yang dibutuhkan (t_0)
- Ulangi untuk 3 kali pengamatan dan dibuat rata-rata
- Setelah itu pipet diisi dengan cairan yang akan diukur viskositasnya dengan prosedur yang sama menggunakan air
- Catat waktu yang dibutuhkan oleh cairan tersebut (t)
- Viskositas spesifik (η_{sp}) didapatkan dengan persamaan $(t-t_0)/t_0$, diasumsikan densitas dari pelarut dan terlarut sama.
- Kurva T_d dari larutan kolagen dibuat dengan membuat viskositas fraksional.
- Viskositas fraksional dihitung dengan persamaan :

$$F(T) = (\eta_{sp}(T) - \eta_{sp}(40C)) / (\eta_{sp}(15C) - \eta_{sp}(40C))$$

- Suhu denaturasi (T_d) didapat dimana viskositas fraksional sebesar 0.5.

e. Penentuan Perlakuan Terbaik (deGarmo, *et al.*, 1979)

Penentuan perlakuan terbaik menggunakan metode indeks efektifitas dengan bobot nilai sebagai berikut :

- a. Parameter-parameter uji fisika dikelompokkan secara terpisah dari parameter uji organoleptik
- b. Masing-masing parameter uji diberi 0-1 pada masing- masing kelompok bobot yang diberi sesuai dengan tingkat kepentingan dalam mempengaruhi konsumen yang diwakili oleh panelis. Adapun cara perhitungan bobot adalah sebagai berikut:
- c. Nilai efektifitas (NE) dapat dihitung dengan menggunakan rumus berikut:

$$\text{bobot} = \frac{\text{nilai total setiap parameter uji}}{\text{nilai total parameter uji}}$$

$$NE = \frac{N_p - N_{tj}}{N_{tb} - N_{tj}}$$

Keterangan :

NE : nilai efektifitas

N_p : nilai perlakuan

N_{tj} : nilai terjelek

N_{tb} : nilai terbaik

- d. Perhitungan Nilai Produk (NP). Nilai produk diperoleh dari perkalian nilai efektifitas dengan bobot nilai, yaitu:

$$NP = NE \times \text{bobot nilai}$$

- e. Nilai produk dari semua parameter pada masing-masing kelompok dijumlahkan, perlakuan yang dimiliki nilai produk tertinggi adalah perlakuan terbaik pada kelompok parameter
- f. Penentuan perlakuan terbaik dipilih dari perlakuan yang memiliki nilai produk tertinggi untuk parameter organoleptik

f. Elektroforesis

1. *Persiapan Gel*

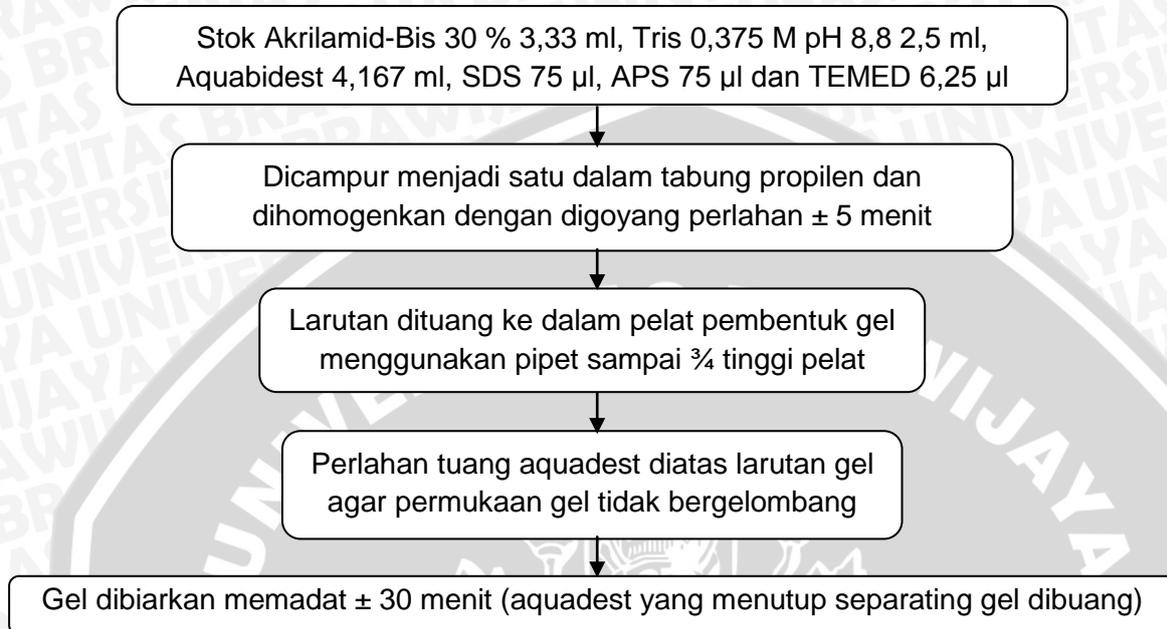
- **Gel Pemisah (Separating Gel)**

Separating gel merupakan media penyangga sebagai tempat bermigrasinya molekul protein. Separating gel 12,5 % dibuat dengan mencampurkan bahan-bahan pembuatan separating gel dalam tabung propilen dengan volume tertentu. Yang pertama dimasukkan adalah 3,33 ml Acrilamide-Bis 30% dicampur dengan 0,375 ml Tris HCl 0,375 M pH 8,8 4,167 ml, Aquabidest 4,167 ml, dan 75 μ l 10% SDS. Bahan tersebut tidak perlu urut ketika dimasukkan dalam tabung propilen.. Selanjutnya ditambahkan 75 μ l 10 % APS dan ditambah dengan 6,25 μ l TEMED. Penambahan kedua bahan ini harus urut dan tabung propopilen digoyang perlahan agar semua bahan tercampur.

Gel poliakrilamid akan dibentuk dari polimer acrilamide dengan suatu *cross linking agent* yaitu N,N'-methylene bisacrilamide. Polimerisasi ini dikatalis oleh APS yang dapat menghasilkan radikal bebas. Pembentukan radikal bebas dari APS dikatalis oleh TEMED. Hal inilah yang menyebabkan mengapa penambahan APS dan TEMED harus urut.

Sesudah semua bahan tercampur maka dituangkan dalam *plate* pembentuk gel dengan menggunakan pipet sampai pada batas *separating gel*. Selanjutnya ditambahkan aquadest agar permukaan gel yang terbentuk rata. Setelah gel terbentuk,

aquadest yang ditambahkan tadi dibuang dan *plate* siap untuk ditambah dengan *stacking gel*. Prosedur pembuatan *separating gel* dapat dilihat pada Gambar dibawah.



Prosedur Pembuatan *Separating Gel*

- **Gel Pengumpul (Stacking Gel)**

Proses pembuatan *stacking gel* ini sama dengan pembuatan *separating gel*, hanya berbeda pada komposisi bahannya. Proses pembuatannya yaitu, dimasukkan tanpa harus urut 0,45 ml 30% Stok Acrilamide-Bis, 0,38 ml 1 M Tris-HCl pH 6,8, 2,11 ml Aquabidest, dan 30 µl 10 % SDS. Selanjutnya ditambahkan dengan urut, 30 µl 10 % APS dan 5 µl TEMED serta digoyang perlahan. Sesudah itu dimasukkan dalam *plate* pembentuk gel di atas *separating gel* yang telah dibuat. Segera setelah penuangan selesai, sisir pembentuk sumur sampel dimasukkan dan ditunggu sampai terbentuk gel dari *stacking gel*. Setelah gel terbentuk, sisir diangkat perlahan-lahan dan sumuran sampel telah terbentuk dalam *stacking gel*. Hal ini berarti gel poliakrilamid siap digunakan untuk tahapan selanjutnya. Prosedur pembuatan *stacking gel* dapat dilihat pada Gambar dibawah ini.

0,45 ml 30% Stok Acrilamide-Bis, 0,38 ml 1 M Tris-HCl pH 6,8, 2,11 ml Aquabidest, dan 30 μ l 10 % SDS, 30 μ l 10 % APS dan 5 μ l TEMED

Dicampur menjadi satu dalam tabung propilen dan dihomogenkan dengan digoyang perlahan \pm 5 menit

Larutan dituang ke dalam pelat pembentuk gel menggunakan pipet sampai penuh

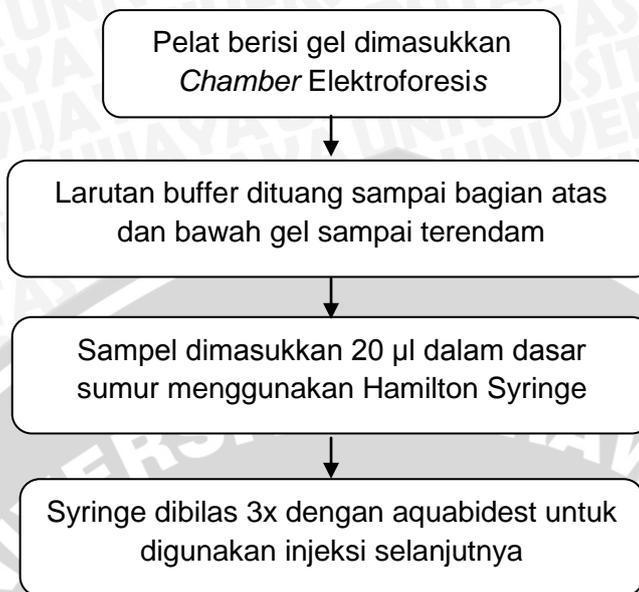
Selipkan sisir pembentuk sumur sampel secara perlahan ke dalam *stacking gel* segera setelah dituang

Setelah gel memadat \pm 30 menit sisir diangkat

Prosedur Pembuatan *Stacking Gel*

2. Injeksi sampel

Plate yang sudah berisi gel dimasukkan dalam *chamber* elektroforesis dan *running buffer* dituang hingga bagian atas dan bawah dari gel terendam oleh *running buffer*. Sampel yang telah disiapkan dimasukkan ke dalam sumur sampel menggunakan syringe sebanyak 20 μ l. Syringe dibilas 3 kali dengan aquades atau *running buffer* sebelum digunakan untuk memasukkan sampel yang berbeda pada sumur sampel berikutnya. Prosedur injeksi sampel dapat dilihat pada Gambar dibawah ini.

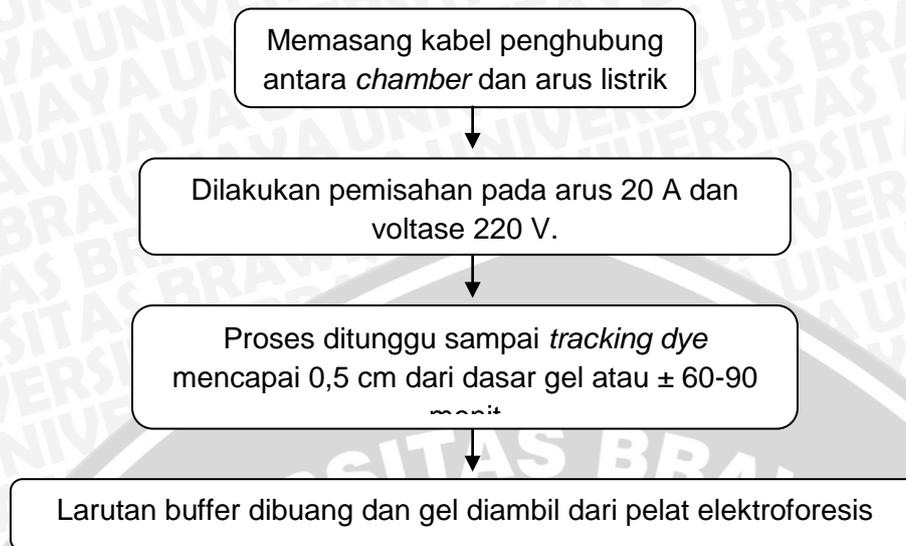


Prosedur Injeksi Sampel

3. Running Sampel

Running sampel merupakan proses pemisahan protein, yang mana protein akan bergerak dari elektroda negatif menuju elektroda positif sampai pada jarak tertentu tergantung pada berat molekulnya.

Pada tahap ini, *chamber* elektroforesis yang lengkap dengan sampel dihubungkan dengan arus listrik dan diatur sistem arus dan voltasenya. *Running* sampel dilakukan pada arus 20 A dan voltase 220 V. *Running* sampel dikatakan selesai apabila warna pelacak atau *tracking dye* mencapai jarak 0,5 cm dari dasar gel atau kurang lebih 60-90 menit. Setelah selesai, *running buffer* dituang dan gel diambil dari *plate* untuk tahapan berikutnya. Prosedur *running* sampel dapat dilihat pada Gambar dibawah.

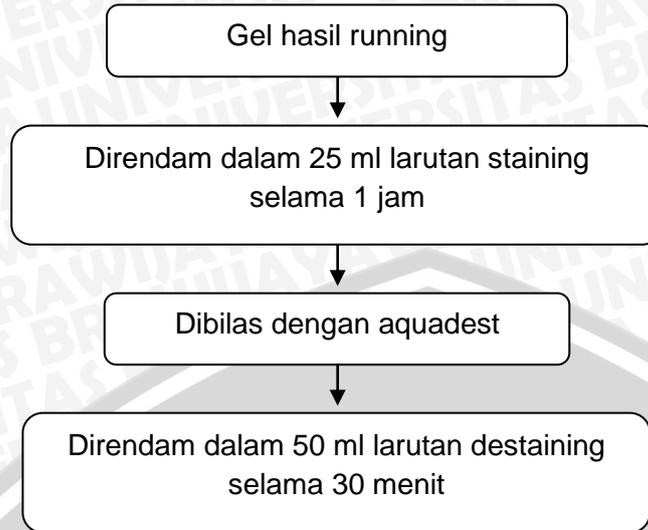


Prosedur *Running* Sampel

4. Pewarnaan Gel (*Staining Gel*)

Pada tahap ini diperlukan larutan *staining* untuk mewarnai protein dan larutan *destaining* untuk menghilangkan warna pada gel dan memperjelas pita protein yang terbentuk. Gel yang telah diambil dari plate direndam dalam 25 ml larutan *staining* selama kurang lebih 1 jam, kemudian dibilas dengan air dan direndam dalam 50 ml larutan *destaining* selama kurang lebih 30 menit atau sampai pita protein terlihat jelas.

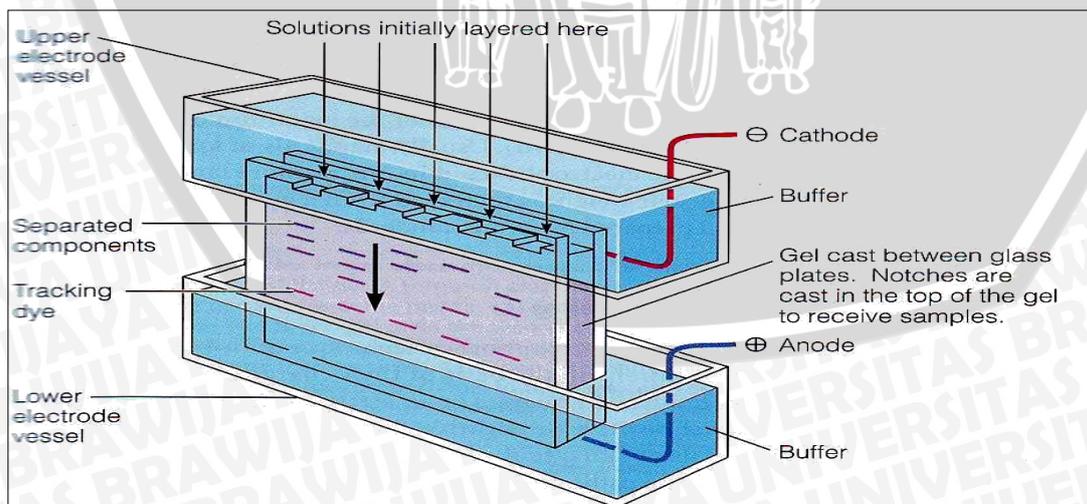
Dalam kondisi tidak diwarnai, protein tidak terlihat dan setelah diwarnai dengan larutan *staining* yang mengandung Coomassive Brilliant Blue R-25 0,01 % yang dilarutkan dalam methanol asam asetat dan air dengan perbandingan tertentu. Gel direndam dalam pewarna, kemudian dibilas dengan asam asetat jenuh. Protein menjadi berwarna biru karena mengikat Coomassive Blue. Dengan demikian dapat ditentukan mobilitas relatif protein untuk kemudian ditentukan berat molekulnya. Prosedur pewarnaan sampel dapat dilihat pada Gambar dibawah.



Prosedur Pewarnaan Sampel

5. Visualisasi

Visualisasi merupakan tahap akhir berupa pencetakan hasil elektroforesis menjadi gambar atau foto, sehingga memudahkan dalam proses penentuan mobilitas relatif dan berat molekul protein. Selain itu juga merupakan proses penentuan konsentrasi protein pada masing-masing pita yang muncul dengan analisa densitometri. Densitometri menggunakan alat densitometer untuk mengetahui hasil elektroforesis secara kuantitatif (Franks, 1993). Gambar rangkaian alat elektroforesis secara keseluruhan dapat dilihat pada Gambar dibawah



Rangkaian Alat Elektroforesis (Mathews, et al, 2000)

Lampiran 9. Dokumentasi Penelitian



Pengambilan Sampel



Sisik Ikan



Ukuran Sisik



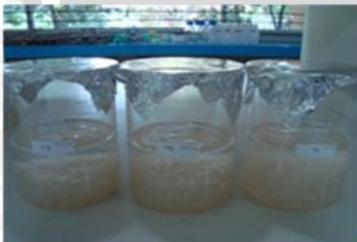
Pencucian



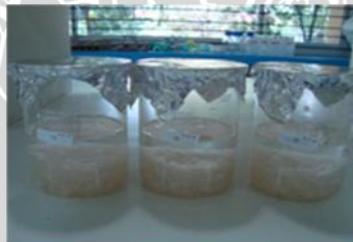
Perendaman NaOH



Perendaman Hexan



EKSTRAKSI ASAM



PRESIPITASI



KOLAGEN



SENTRIFUSE