

**PROFIL PEPTIDA KOLAGEN DALAM HIDROLISAT KOLAGEN
SISIK IKAN GABUS (*Channa striata*) HASIL EKSTRAKSI
MENGUNAKAN ENZIM PAPAIN**

SKRIPSI

oleh
WITIYA ALMADA
145090107111014



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

**PROFIL PEPTIDA KOLAGEN DALAM HIDROLISAT KOLAGEN
SISIK IKAN GABUS (*Channa striata*) HASIL EKSTRAKSI
MENGUNAKAN ENZIM PAPAİN**

SKRIPSI

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

oleh
WITIYA ALMADA
145090107111014



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

HALAMAN PENGESAHAN

PROFIL PEPTIDA KOLAGEN DALAM HIDROLISAT KOLAGEN SISIK IKAN GABUS (*Channa striata*) HASIL EKSTRAKSI MENGGUNAKAN ENZIM PAPAİN

WITIYA ALMADA
145090107111014

Telah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 16 Juli 2018
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar Sarjana
Sains dalam Bidang Biologi



Menyetujui
Pembimbing

Drs. Aris Soewondo, M.Si
NIP 19641122 199002 1 001

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

Rodliyati Azrianingsih, S.Si., M. Sc., Ph.D.
NIP 19700128 199412 2 001

HALAMAN PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Witiya Almada
NIM : 145090107111014
Jurusan : Biologi
Penulis Skripsi berjudul : Profil Peptida Kolagen dalam Hidrolisat Kolagen Sisik Ikan Gabus (*Channa striata*) Hasil Ekstraksi Menggunakan Enzim Papain

Dengan ini menyatakan bahwa:

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

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran

Malang, 23 Juli 2018
Yang menyatakan

Witiya Almada
145090107111014

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

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



Profil Peptida Kolagen dalam Hidrolisat Kolagen Sisik Ikan Gabus (*Channa striata*) Hasil Ekstraksi Menggunakan Enzim Papain

Witiya Almada, Aris Soewondo
Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Brawijaya
2018

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis profil peptida kolagen sisik ikan gabus (*Channa striata*) dari hasil ekstraksi enzimatis menggunakan enzim papain. Metode penelitian ini diawali isolasi enzim papain dari getah pepaya (*Carica papaya L.*). *Crude* papain dipresipitasi menggunakan etanol absolut dan *crude* papain non-presipitasi digunakan untuk ekstraksi enzimatis sisik ikan gabus setelah *pre-treatment* oleh NaOH dan Na₂EDTA. Hasil ekstraksi dibedakan menjadi dua kelompok sampel, yaitu hidrolisat kolagen non-freeze dry dan freeze dry. Konsentrasi hidrolisat kolagen dan *crude* papain ditentukan melalui uji Bradford. Penentuan berat molekul peptida berdasarkan SDS-PAGE konsentrasi *separating gel* 15% dengan kontrol *crude* papain. Kurva standar protein dan berat molekul (BM) ditampilkan dalam bentuk grafik dengan *Ms. Excel*. Perbedaan rerata konsentrasi sampel ditentukan melalui *Independent-Samples T Test* dengan selang kepercayaan 95%. Hasil menunjukkan bahwa terdapat perbedaan rerata konsentrasi antara *crude* papain non-presipitasi dengan presipitasi, sedangkan rerata konsentrasi hidrolisat kolagen non-freeze dry dan freeze dry tidak berbeda signifikan berdasarkan analisis statistik dengan *Independent-Sample T Test* ($p < 0,05$). Hasil visualisasi SDS-PAGE pada sampel hidrolisat kolagen hanya tampak *band* dengan BM 24 kDa yang teridentifikasi sebagai papain. Profil peptida kolagen dalam hidrolisat kolagen sisik ikan gabus hasil ekstraksi menggunakan enzim papain memiliki berat molekul < 10 kDa pada penelitian ini.

Kata kunci: Enzim papain, peptida kolagen, *SDS-PAGE*, sisik ikan gabus

Peptide Profile of Snakehead (*Channa striata*) Fish Scale Collagen Hydrolysate Derived from Extraction by Papain Enzyme

Witiya Almada, Aris Soewondo

Biology Departement, Faculty of Mathematics and Natural Sciences,
Brawijaya University
2018

ABSTRACT

The aims of this experiment to analyze the peptide profile of snakehead fish scales (*Channa striata*) derived from enzymatic extraction by papain enzyme. The method begins with the isolation of papain enzyme from papaya latex (*Carica papaya* L.). Crude papain was precipitated using absolute ethanol and non-precipitation crude papain was used for the enzymatic extraction of fish scales after pre-treatment by NaOH and Na₂EDTA. The extraction results were divided into two groups of samples, collagen hydrolysate non-freeze dry and freeze dry. The concentration of collagen hydrolysate and crude papain was determined by Bradford assay. Peptide molecular weight was estimated based on SDS-PAGE with 15% separating gel concentration using crude papain as control. Standard protein curve and molecular weight (MW) are shown in graphical form with Ms. Excel. The average difference of sample concentration was determined through Independent-Samples T Test with 95% confidence interval. The results showed that there was a difference of mean concentration between non-precipitation crude papain with precipitation, whereas the mean of non-freeze dry and freeze dry collagen hydrolysate concentration was not significantly different based on statistical analysis with Independent-Sample T Test ($p < 0,05$). The SDS-PAGE visualization results in collagen hydrolysate samples only appeared with a band of 24 kDa identified as papain. Profile of collagen peptide in hydrolysate collagen of snakehead fish scales extracted by papain enzyme have molecular weight < 10 kDa in this study.

Keywords: Collagen peptide, papain enzyme, SDS-PAGE, snakehead fish scales

KATA PENGANTAR

Segala puji bagi Allah SWT Yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang atas segala rahmat dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan naskah skripsi dengan sebaik-baiknya. Pada kesempatan ini, penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. Prof. Widodo, S.Si, M.Si., Ph.D selaku dosen pembimbing selama TKPS, yang selalu menginspirasi penulis untuk mengembangkan ide penelitian. Drs. Aris Soewondo, M.Si (dosen pembimbing), Prof. Muhaimin Rifa'i, Ph.D. Med. Sc dan Dr. Sri Widyarti, M.Si (dosen penguji) yang telah mendampingi, memberikan kritik dan saran bagi penelitian.
2. Papa (Widarto), Mama (Sri Suwarti) dan Adik (Nika Arta Sofiyati) atas kasih sayang yang telah diberikan serta dukungan moral dan materiil sehingga penulis dapat menempuh pendidikan sampai saat ini.
3. Jira F.D. Huma, Kinanti N. Prasasti, Shella C. Natasia, Joice A.H. Ga, Firanindah Firmadi beserta teman-teman seperjuangan, biologi angkatan 2014 yang telah memberikan dukungan yang tidak terkira kepada penulis.
4. Mbak Pantris, Mbak Sapti, Mas Bambang, Mbak Nadya, Mas Yance, Mbak Mulya, Mbak Intan dan teman-teman lab. Anfis yang telah meluangkan waktu untuk berdiskusi dan membantu penulis selama penelitian di laboratorium.
5. Farhan Wildan Abdurochman, yang telah membantu dan selalu memberikan semangat kepada penulis selama pengerjaan skripsi.

Semoga Allah SWT memberikan balasan yang berlipat ganda pada seluruh pihak yang bersangkutan. Saran dan kritik yang membangun sangat diharapkan untuk menjadikan karya ini semakin bermanfaat.

Malang, 23 Juli 2018

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN	xiii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan Penelitian	2
1.4 Manfaat Penelitian	2
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Kolagen	4
2.2 Hidrolisat dan Peptida Kolagen	6
2.3 Sumber Kolagen.....	7
2.4 Kolagen Sisik Ikan.....	7
2.5 Enzim Papain	7
BAB III METODE PENELITIAN	10
3.1 Waktu dan Tempat	10
3.2 Preparasi Enzim Papain.....	10
3.3 Pre-treatment & Ekstraksi Enzimatis Kolagen Sisik Ikan Gabus.....	10
3.4 Uji Bradford	11
3.5 SDS-PAGE.....	11
3.6 Analisis Data	12
3.7 Kerangka Operasional	12
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	13
4.1 Konsentrasi <i>Crude</i> Papain dan Hidrolisat Kolagen Sisik Ikan Gabus (<i>C. striata</i>).....	13



4.2 Analisis Profil Peptida Kolagen dalam Hidrolisat
Kolagen Sisik Ikan Gabus Berdasarkan SDS-PAGE.... 16

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN 21
5.1 Kesimpulan 21
5.2 Saran..... 21

DAFTAR PUSTAKA 22
LAMPIRAN..... 27



DAFTAR TABEL

Nomor	Halaman
1	Tipe-tipe kolagen mamalia dan letaknya dalam jaringan 5
2	Susunan molekul heterotrimer dan homodimer dari berbagai tipe kolagen 6
3	Pembuatan 0,1 M Buffer Fosfat pH 7 27
4	Pengenceran BSA untuk kurva standar 27
5	Komposisi <i>separating</i> dan <i>stacking gel</i> SDS-PAGE..... 27
6	Komposisi 1x <i>running buffer</i> SDS-PAGE 27
7	Komposisi <i>staining</i> dan <i>destaining solution</i> SDS-PAGE ... 28
8	Konsentrasi enzim papain berdasarkan perhitungan dari persamaan kurva standar BSA 29
9	Konsentrasi protein sampel hidrolisat kolagen berdasarkan perhitungan dari persamaan kurva standar BSA 30
10	Konversi berat molekul protein hidrolisat kolagen & papain 33



DAFTAR GAMBAR

Nomor		Halaman
1	Struktur kolagen	4
2	Struktur tiga dimensi enzim papain dengan sisi aktif.....	9
3	Bagan metode penelitian	12
4	Konsentrasi <i>crude</i> papain pada perlakuan non-presipitasi dan presipitasi	13
5	Konsentrasi hidrolisat kolagen non- <i>freeze dry</i> dan <i>freeze dry</i> sisik ikan gabus (<i>C. striata</i>).....	15
6	Hasil visualisasi SDS-PAGE sampel hidrolisat kolagen dan enzim papain dengan <i>separating</i> gel 15%	17
7	Analisis SDS-PAGE penelitian Pitprecha & Damrongsakkul	18
8	Peptida kolagen dengan berat molekul 2 kDa	20
9	Kurva standar protein BSA berdasarkan uji Bradford	29
10	Kurva standar berat molekul protein marker dengan persamaan regresi	33



DAFTAR LAMPIRAN

Nomor		Halaman
1	Metode Penelitian.....	27
2	Konsentrasi protein papain dan hidrolisat kolagen	29
3	Uji <i>Independent-Samples T Test</i> sampel papain.....	31
4	Uji <i>Independent-Samples T Test</i> sampel hidrolisat kolagen	32
5	Kurva standar dan penentuan berat molekul sampel hidrolisat dan enzim papain.....	33



DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN

<u>Simbol/Singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
BM	Berat Molekul
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
BSE	<i>Bovine Spongiform Encephalopathy</i>
Cys	<i>Cysteine</i>
ECM	<i>Extra Cellular Matrix</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbant Assay</i>
FTIR	<i>Fourier-Transform Infrared Spectroscopy</i>
Gln	<i>Glutamine</i>
His	<i>Histidine</i>
Hyp	<i>Hydroxyproline</i>
MW	<i>Molecular Weight</i>
pH	<i>power of Hydrogen</i>
Pro	<i>Proline</i>
Rf	<i>Retention factor</i>
Rpm	<i>Rotation per minute</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulphate- Poliacrilamide Gel Electrophoresis</i>
TSE	<i>Transmissible Spongiform Encephalopathy</i>

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



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kolagen merupakan protein komponen matriks ekstraseluler, memiliki struktur *triple helix* dan diproduksi oleh fibroblas. Protein kolagen telah dikelompokkan ke dalam 28 tipe dan terdistribusi di berbagai jaringan, meliputi epidermis, dermis dan tulang rawan. Kolagen berfungsi untuk menyediakan rigiditas sel dan elastisitas pada kulit (Sibilla dkk, 2015). Kolagen juga berperan sebagai *cellular microenvironment* (Gelse dkk., 2003; Silvipriya dkk., 2015). Kolagen tipe I, II dan III adalah yang paling melimpah dan banyak diteliti untuk kepentingan biomedis (Mocan dkk., 2011).

Kolagen saat ini banyak dimanfaatkan dalam produksi kosmetik, suplemen makanan dan protein *carrier* untuk obat-obatan (Kim, 2013). Kolagen pada industri umumnya diproduksi dari kulit sapi dan babi. Namun, kolagen dari mamalia tersebut dikhawatirkan terkontaminasi oleh beberapa penyakit, seperti *BSE*, *TSE*, *Foot and Mouth Disease* serta infeksi cacing pita (Liu dkk., 2015). Permasalahan budaya dan kepercayaan juga menjadi pertimbangan utama dalam penggunaan kolagen yang bersumber dari sapi dan babi (Regenstein dkk., 2003). Oleh karena itu, diperlukan sumber alternatif kolagen seperti sisik ikan yang berpotensi dapat menggantikan sumber kolagen mamalia. Pemanfaatan sisik ikan untuk sumber kolagen telah dilakukan pada beberapa spesies, antara lain ikan perairan tawar (tilapia), sardine, deep-sea redfish dan lain-lain (Gomez-Guillen dkk, 2011).

Salah satu spesies ikan air tawar yang cukup melimpah di Indonesia dan dapat dijadikan alternatif sumber kolagen adalah ikan gabus (*Channa striata*) (Wulandari dkk., 2015). Jumlah total tangkapan ikan gabus di perairan mengalami kenaikan dengan rata-rata sebesar 2,75% per tahun (Fuadi dkk., 2017). Limbah sisik ikan diduga ikut mengalami kenaikan seiring dengan peningkatan jumlah hasil tangkapan ikan. Sisik ikan menurut Budirahardjo (2010) menjadi salah satu limbah terpenting dari ikan yang belum dimanfaatkan secara optimal. Sisik ialah derivat jaringan dermis yang sebagian besar mengandung kolagen tipe I dan *hydroxyapatite* $\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6$ (Noohrm dkk., 2014; Sibilla dkk, 2015). Fakta tersebut menjadikan sisik ikan gabus dapat dimanfaatkan sebagai

sumber kolagen untuk mengatasi permasalahan dalam pengolahan limbah perikanan.

Kolagen dengan berat molekul 0,3-8 kDa disebut peptida kolagen (Sibilla dkk., 2015). Peptida kolagen diketahui memiliki beberapa aktivitas biologis, meliputi antihipertensi, antidiabetes, antioksidan serta menjaga kesehatan kulit, tulang dan sendi (Fu dkk., 2018). Peptida dalam hidrolisat kolagen lebih efektif dihasilkan melalui ekstraksi enzimatik (Manikkam dkk., 2016). Salah satu enzim protease dapat dimanfaatkan untuk hidrolisis kolagen melalui ekstraksi enzimatik, yaitu enzim papain (Ilchenco dkk., 2017).

Papain merupakan kelompok enzim protease yang berasal dari getah pepaya (*Carica papaya* L.). Papain diketahui memiliki sisi pemotongan yang unik pada substrat kolagen (Ramachandran, 1976). Ekstraksi kolagen dengan menggunakan enzim papain pada sumber kolagen sisik ikan gabus belum banyak dilakukan. Selain itu, informasi tentang profil peptida dari hidrolisat kolagen hasil ekstraksi berdasarkan analisis SDS-PAGE juga masih terbatas. SDS-PAGE dalam hal ini digunakan untuk menilai keberhasilan ekstraksi kolagen. Berdasarkan beberapa hal tersebut, menjadikan penelitian ini penting untuk dilakukan dalam upaya untuk menganalisis profil peptida kolagen hasil dari ekstraksi enzimatik menggunakan enzim papain.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut, rumusan masalah pada penelitian ini adalah bagaimanakah profil peptida kolagen sisik ikan gabus (*C. striata*) dari hasil ekstraksi menggunakan enzim papain ?

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dengan tujuan untuk menganalisis profil peptida kolagen sisik ikan gabus (*C. striata*) dari hasil ekstraksi menggunakan enzim papain.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini dilakukan sebagai upaya pemanfaatan limbah sisik ikan untuk menjadi alternatif sumber kolagen selain *mammalian collagen*. Hasil penelitian diharapkan dapat menjadi salah satu

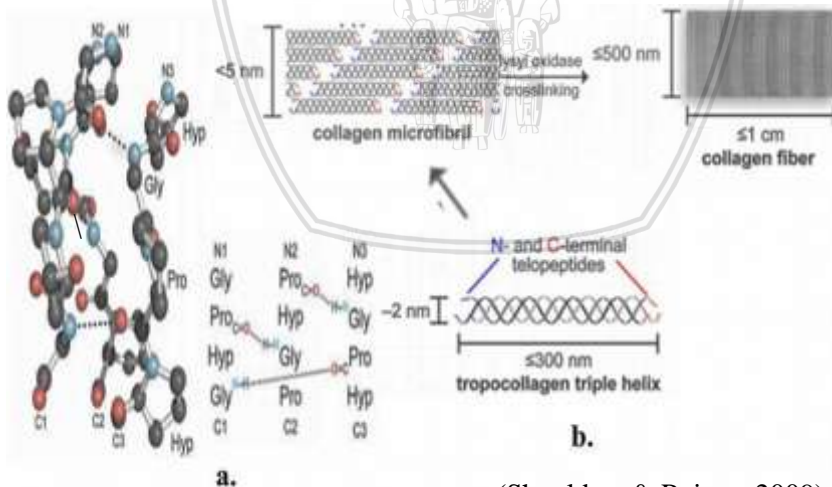
referensi untuk penelitian lanjutan tentang karakterisasi dan eksplorasi terhadap fungsi biologis dari peptida kolagen, secara *in vitro* maupun *in silico*.



BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kolagen

Kolagen merupakan protein struktural yang ditemukan melimpah pada jaringan hewan. Kolagen pada manusia menyusun kurang lebih 1/3 dari total protein serta merupakan salah satu komponen protein pada matriks ekstraseluler (ECM). Kolagen memiliki struktur tiga rantai polipeptida yang disebut dengan *triple helix* (Shoulders & Raines, 2009; Silvipriya dkk., 2015). Kolagen memiliki struktur domain yang kaya akan susunan berupa Gly-Pro-Hyp (Gambar 1a), dimana Pro dan Hyp adalah residu asam amino prolin dan hidroksiprolin (Gelse dkk., 2003). Kolagen mengandung sekitar 33 % glisin, 10 % prolin dan 10 % hidroksiprolin dari total asam amino penyusun kolagen (Iltchenko dkk., 2017). Struktur *triple helix* kolagen yang tersusun secara kompleks membentuk serat fibril disebut tropokolagen (Gambar 1b) (Shoulders & Raines, 2009).



(Shoulders & Raines, 2009)

Gambar 1. Struktur kolagen. a. Susunan asam amino kolagen dan b. Tropokolagen & struktur fibril

Kolagen memiliki fungsi antara lain menyediakan rigiditas sel, integritas struktur jaringan dan sebagai *cellular microenvironment* (Gelse dkk., 2003). Kolagen tipe I pada mamalia teridentifikasi dengan berat molekul sekitar 300 kDa, sedangkan hidrolisat kolagen memiliki berat molekul sekitar 50 kDa (Zhang dkk., 2005). Kolagen memiliki 28 tipe yang teridentifikasi, dikelompokkan berdasarkan tipe kolagen dan letaknya dalam jaringan (Tabel 1).

Tabel 1. Tipe-tipe kolagen mamalia dan letaknya dalam jaringan

	Tipe kolagen	Letak
<i>Fibril forming collagens</i>	I, II, III, V dan XI	Jaringan dermis, tulang rawan, kulit dan serat retikuler
<i>Basement membrane collagens</i>	IV	membran basal
<i>Microfibrillar collagens</i>	VI	dermis, tulang rawan dan dinding pembuluh darah
<i>Anchoring fibril collagens</i>	VII	kulit, epidermal-dermal junction, serviks dan mukosa oral
<i>Hexagonal network-forming collagens</i>	VIII dan X	sel endotel dan tulang rawan
<i>FACIT collagens</i>	IX, XII, XIV, XIX, XX dan XXI	tulang rawan, perikondrium, dermis, dinding pembuluh darah, kulit embrionik, tendon dan ligamen
<i>Transmembrane collagens</i>	XIII dan XVII	epidermis, folikel rambut dan kondrosit
<i>Multiplexins</i>	XV, XVI, dan XVIII	fibroblas, sel otot polos, keratinosit, paru-paru dan liver

(Gelse dkk., 2003)

Semua tipe kolagen memiliki struktur *triple helix* yang disusun oleh 3 rantai- α . Struktur molekul kolagen antara lain heterotrimer dan homodimer (Tabel 2). Heterotrimer yaitu kolagen yang tersusun atas dua atau lebih rantai polipeptida berbeda, sedangkan apabila kolagen tersusun dari tiga rantai polipeptida identik disebut homodimer. Kolagen heterotrimer misalnya kolagen tipe I, IV, V, VI, IX dan XI. Kolagen tipe II, III, VII, VIII, X termasuk homodimer (Gelse dkk., 2003).

Tabel 2. Susunan molekul heterotrimer dan homodimer dari berbagai tipe kolagen

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

(Gelse dkk., 2003)

2.2 Hidrolisat dan Peptida Kolagen

Hidrolisat kolagen adalah polipeptida hasil dari hidrolisis kolagen (Zhang dkk., 2005). Peptida kolagen terdapat di dalam hidrolisat kolagen dan bersifat mudah diserap oleh tubuh. Peptida kolagen memiliki berat molekul lebih kecil daripada *native* kolagen, yaitu 0,3-8 kDa (Sibilla dkk., 2015). Peptida kolagen juga memiliki motif khas dari kolagen, yaitu Gly-X-Y yang berupa susunan asam amino glisin-prolin-hidroksiprolin. Keberadaan motif kolagen tersebut memungkinkan peptida kolagen tetap fungsional (Hayes, 2011; Venkatesan dkk., 2017).

2.3 Sumber Kolagen

Sumber kolagen yakni hewan yang sering dimanfaatkan bagian tubuhnya karena mengandung kolagen. *Bovine* (sapi) termasuk mamalia yang sering dimanfaatkan bagian tulang dan kulitnya sebagai alternatif sumber kolagen. *Porcine* (babi) diambil bagian kulit dan tulangnya untuk produksi kolagen dalam skala industri. Kolagen dari hewan-hewan perairan dikenal dengan *marine collagen*. Kolagen jenis ini juga banyak dimanfaatkan karena diduga dapat menggantikan kolagen dari mamalia. Kolagen tersebut memiliki tingkat antigenisitas yang rendah jika dibandingkan dengan kolagen mamalia. Kolagen dari hewan perairan terdapat dalam invertebrata laut yaitu gurita, ubur-ubur, *cuttlefish*, bintang laut, kepiting, bulu babi dan teripang. Bagian ikan yang sering dimanfaatkan yaitu kulit, tulang dan sisik sebagai sumber kolagen (Zhang dkk., 2005; Silvipriya dkk., 2015).

Kolagen hewan perairan diketahui memiliki susunan asam amino yang mirip dengan kolagen dari mamalia. Jumlah asam amino hidroksiprolin dan prolin lebih sedikit dibandingkan dengan kolagen mamalia. Namun, asam amino lainnya, yaitu serin, threonin, methionin dan hidroksilisin jumlahnya lebih banyak (Noomhorm dkk., 2014).

2.4 Kolagen Sisik Ikan

Sumber kolagen selain dari mamalia adalah sisik ikan yang disebut dengan *fish scales collagen*. Sisik ikan mengandung kolagen tipe I dan *calcium hydroxyapatite* ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$). Kolagen tipe I sisik ikan diketahui ditutupi oleh 16-59% garam kalsium dengan ketebalan kristal sekitar 1,5-4 nm (Ikoma dkk., 2003; Sionkowska & Kozłowska, 2014). Lapisan kolagen pada sisik ikan bersifat kaku dan memiliki fleksibilitas rendah akibat proses mineralisasi. Fase mineral terdiri dari *calcium hydroxyapatite*, dengan sejumlah ion natrium, magnesium, karbonat dan fosfat (Setyowati & Setyani, 2015).

2.5 Enzim Papain

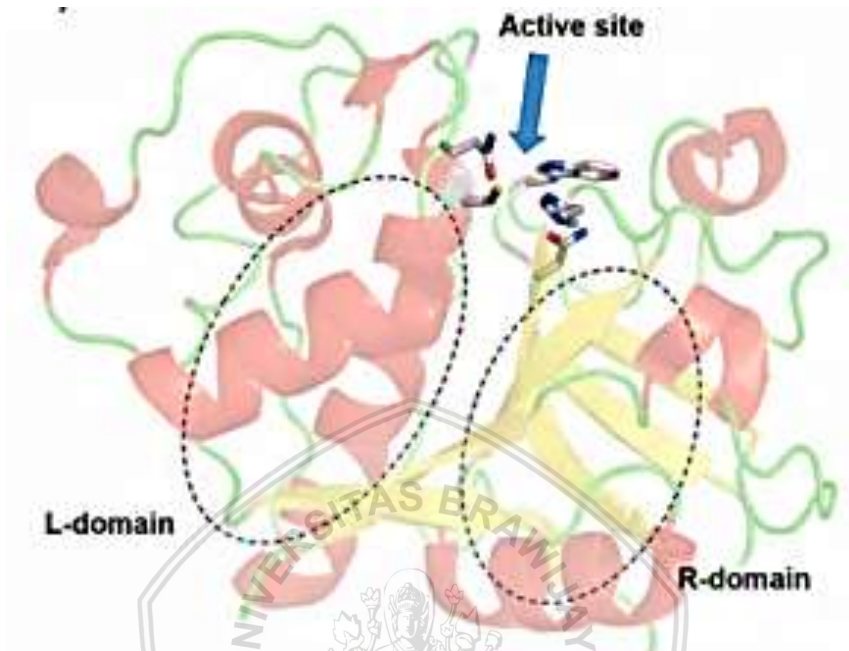
Papain (EC 3.4.22.2) adalah jenis enzim proteolitik dari kelompok proteinase sistein. Papain secara alami ditemukan dalam getah buah pepaya (*Carica papaya* L.) yang belum matang. Aktivitas papain

paling baik terdapat pada buah pepaya yang memiliki warna hijau tua. Papain menunjukkan aktivitas proteolitik terhadap protein, rantai pendek polipeptida, ester, asam amino dan amida. Enzim ini memotong ikatan peptida asam amino arginin, lisin dan residu fenilalanin. Enzim papain dimanfaatkan dalam desain obat, pengempuk daging dan industri farmasi (Amri & Mamboya, 2012). Papain yang dimanfaatkan pada skala industri memiliki suhu optimum 40-50 °C dengan pH optimum pada 5,5-7 (Dubey dkk., 2007). Sementara, literatur lain menyatakan rentang pH enzim ini adalah 0-10 dan stabil pada pH netral yaitu 7 (Hullikere dkk, 2014).

Papain merupakan enzim sulfhidril yang diisolasi dari *papaya latex*, enzim ini memiliki aktivitas optimum pada pH 5 dan 7,5 dengan suhu antara 70 °C sampai 90 °C. Kerja enzim papain dapat diaktivasi oleh agen sulfhidril (Muruges Babu, 2013). Papain memiliki aktivator enzim berupa sianida atau hidrogen sulfida. Jika tidak tersedia senyawa tersebut maka dapat digantikan oleh natrium thiosulfat atau campuran natrium hidrosulfida (Roy Choudhury, 2011).

Papain tergolong protein globular yang memiliki *accession number* pada PDB yaitu 1CVZ. Papain diidentifikasi sebagai protein rantai tunggal yang memiliki berat molekul sebesar 23,406 kDa (Amri & Mamboya, 2012). Papain tersusun atas struktur α -*helix* dan β -*barrel* yang disebut dengan istilah L-domain dan R-domain (Gambar 2). Papain memiliki sisi aktif yang terletak berhadapan antara L-domain dengan R-domain, terdapat tiga ikatan disulfida dan empat residu asam amino, yaitu *cysteine* (Cys), *histidine* (His), asparagin (Asn) dan glutamin (Gln) (Fernandez-Lukaz dkk., 2017).

Enzim papain aktif menghidrolisis ikatan peptida diantara gugus karboksil dari (lisin atau arginin) dan residu asam amino. Pemotongan juga terjadi pada ikatan peptida diantara gugus karboksil dari histidin dan residu glisin, asam glutamat, glutamin, leusin dan tirosin (Muruges Babu, 2013). Pada substrat protein kolagen, papain diketahui dapat mendegradasi bagian non-*helix* (telopeptida). Protease ini juga dapat memotong bagian *helix* dari kolagen fibril pada kondisi fisiologis tertentu (Ramachandran, 1976).



(Fernandez-Lucas dkk., 2017)

Gambar 2. Struktur tiga dimensi enzim papain dengan sisi aktif

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari - Mei 2018. Penelitian bertempat di Laboratorium Anatomi Fisiologi Hewan, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya.

3.2 Preparasi Enzim Papain

Getah pepaya dicampur dengan 0,1 M buffer fosfat pH 7 (1:10). Sampel dicampur dengan cara *inverting* beberapa kali dan diinkubasi pada suhu 4 °C selama 2 jam. Sentrifugasi pada kecepatan 4.000 rpm, 4 °C selama 15 menit. Supernatan enzim dipresipitasi dengan etanol absolut sebagai papain presipitasi. Supernatan papain non-presipitasi digunakan untuk ekstraksi kolagen sisik ikan secara enzimatis. Konsentrasi papain non-presipitasi dan papain presipitasi ditentukan dengan uji Bradford (Kusumadjaja & Dewi, 2005).

3.3 Pre-treatment & Ekstraksi Enzimatis Kolagen Sisik Ikan Gabus

Pre-treatment sisik ikan gabus dengan 0,1 M NaOH (1:8) selama 6 jam. Larutan NaOH diganti setiap 2 jam sekali. Sisik dibilas dengan ddH₂O dingin, kemudian diinkubasi dengan 0,5 M Na₂EDTA pH 7,5 (1:10) selama 24 jam. Sisik dibilas dengan ddH₂O dingin (Duan dkk., 2009).

Enzim papain dalam supernatan getah pepaya dicampur dengan sisik ikan gabus hasil pre-treatment dengan perbandingan 9:1 dalam botol kaca. Sampel diinkubasi di dalam *waterbath* suhu 50 °C selama 3 jam. Aktivitas enzim papain dihentikan dengan inkubasi sampel pada suhu 90-95 °C selama 10 menit. Sampel hidrolisat kolagen dibedakan menjadi dua perlakuan, yaitu *freeze dry* dan *non-freeze dry* (Chai dkk., 2010, dengan modifikasi).

3.4 Uji Bradford

Uji Bradford dilakukan berdasarkan protokol standar *microplate*. Langkah awal, 1x reagen Bio-Rad dikeluarkan dari tempat penyimpanan 4°C dan didiamkan pada suhu ruang beberapa saat. Reagen pewarna dicampur dengan cara *inverting* beberapa kali sebelum penggunaan. Stok BSA 2 mg/mL dibuat pengenceran untuk kurva standar sesuai pada lampiran (LT4). Diluen yang digunakan untuk pengenceran ialah 0,1 M Buffer Fosfat pH 7. Standar BSA dan sampel protein masing-masing dipipet 5 µL ke dalam *wellplate*, kemudian ditambahkan 250 µL reagen Bradford. Campuran protein-reagen diresuspensi menggunakan pipet *multichannel*. Sampel diinkubasi pada suhu ruang minimal 5 menit tetapi tidak lebih dari 1 jam. Setelah inkubasi, nilai absorbansi diukur menggunakan *ELISA reader* dengan panjang gelombang 630 nm. Nilai absorbansi yang diperoleh digunakan untuk menghitung kadar protein masing-masing sampel dengan persamaan garis linear dari kurva standar protein BSA (Bio-Rad, 2017).

3.5 SDS-PAGE (Roche, 2017)

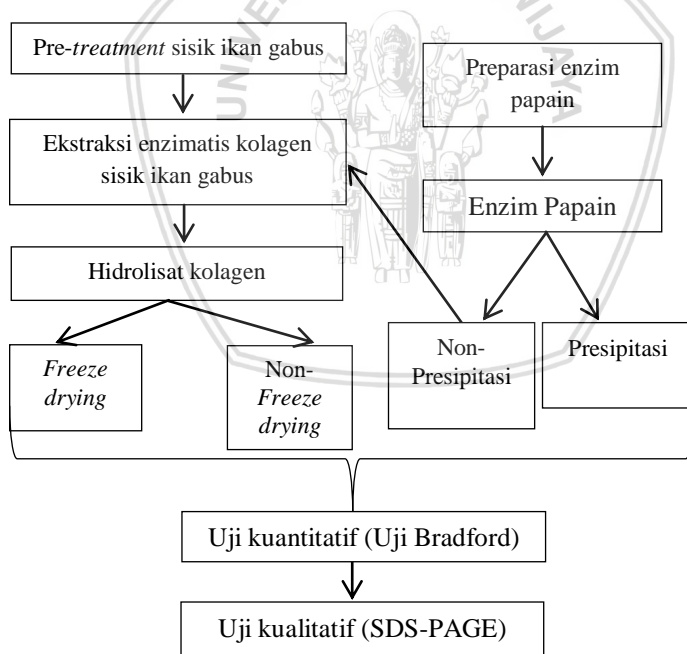
Sampel protein dipreparasi pada mikrotube dengan penambahan RSB sebanyak 15 µL kemudian dipanaskan dengan suhu 95 °C selama 5 menit. *Handcasting* beserta *plate* disiapkan untuk pembuatan gel poliakrilamida. Pembuatan *separating gel* 15 % sesuai dengan komposisi pada lampiran (LT5). Campuran *separating gel* dituang ke dalam *plate* sampai batas hijau lalu lapisan atas *gel* ditambahkan akuabides sampai batas. Gel dibiarkan hingga mengeras selama 45 menit, kemudian dibuat *stacking gel* 5 % sesuai dengan komposisi pada lampiran (LT5). Akuabides dibuang dari *plate*, campuran *stacking gel* ditambahkan ke dalam *plate* sampai batas dan dipasang sisiran elektroforesis. Gel dibiarkan hingga mengeras selama 30 menit kemudian sisiran dilepas. *Plate* berisi gel dimasukkan ke dalam *chamber*. *Running buffer* (LT6) ditambahkan hingga gel terendam. Sampel yang telah dipreparasi, dimasukkan sebanyak 15 µL pada tiap sumuran, sedangkan sumuran pertama berisi 3 µL marker protein (Bio-Rad Protein Ladder), kemudian *running* pada 60 mA hingga *tracking dye* berada pada 0,5 cm dari batas bawah. Selanjutnya, gel direndam dalam larutan *staining* (LT7) selama 15 menit. Gel kemudian dicuci dengan akuades lalu direndam

dalam larutan *destaining* (LT7) hingga warna pita protein yang terbentuk tampak kontras dengan area lain pada gel. Selanjutnya, gel diamati dan dihitung jarak pergerakan proteinnya (Rf) untuk menentukan berat molekul protein dengan menggunakan kurva standar dari protein marker (Roche, 2017).

3.6 Analisis Data

Uji statistik dilakukan menggunakan *software SPSS 16.0 for windows*. Konsentrasi protein sampel hidrolisat kolagen dan enzim papain dianalisis menggunakan uji *Independent-Sampel T Test* dengan selang kepercayaan 95 %. Kurva standar protein BSA dan kurva standar berat molekul dianalisis menggunakan *software Ms. Excel* dengan menampilkan persamaan regresi linear.

3.7 Kerangka Operasional

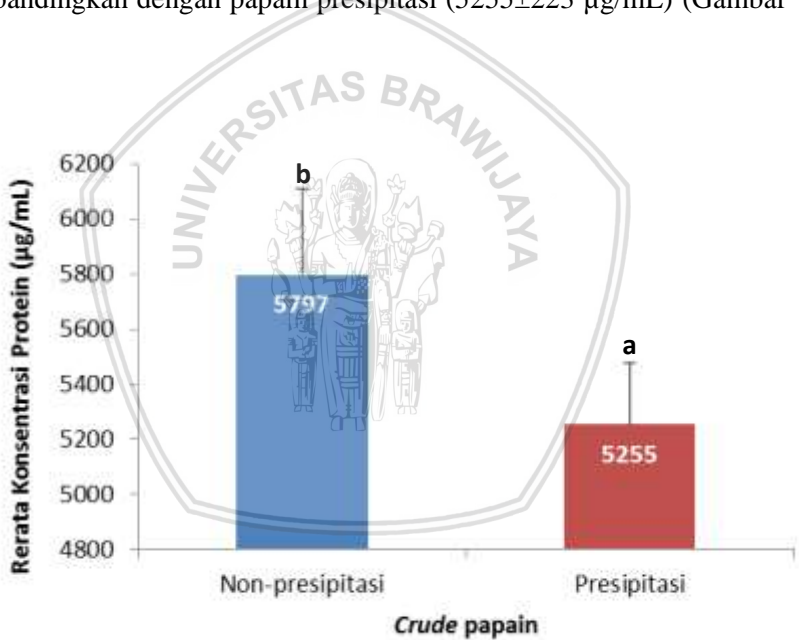


Gambar 3. Bagan metode penelitian

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Konsentrasi *Crude* Papain dan Hidrolisat Kolagen Sisik Ikan Gabus (*C. striata*)

Terdapat perbedaan yang signifikan antara rerata konsentrasi sampel *crude* papain pada perlakuan non-presipitasi dan presipitasi berdasarkan hasil analisis statistik dengan *Independent-Sample T Test* ($p < 0,05$). *Crude* papain dengan perlakuan non-presipitasi memiliki rerata konsentrasi protein lebih tinggi ($5797 \pm 312,5 \mu\text{g/mL}$) dibandingkan dengan papain presipitasi ($5255 \pm 223 \mu\text{g/mL}$) (Gambar 4).



Gambar 4. Konsentrasi *crude* papain pada perlakuan non-presipitasi dan presipitasi

Enzim papain yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari sampel *crude* papain non-presipitasi. Papain non-presipitasi digunakan pada ekstraksi enzimatis kolagen dengan pertimbangan yaitu lebih praktis dalam penggunaannya dan memiliki konsentrasi

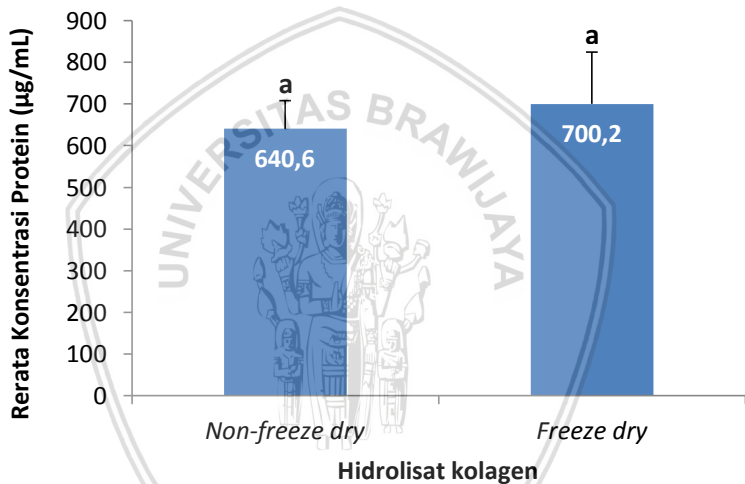
protein yang lebih tinggi berdasarkan hasil uji Bradford. Penelitian lain juga melaporkan hasil yang serupa berdasarkan Uji Bradford, *crude* papain non presipitasi memiliki konsentrasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan papain yang dipresipitasi dengan pelarut organik (etanol dan metanol) serta ammonium sulfat. Konsentrasi ini juga menunjukkan aktivitas enzimatis papain, *crude* papain memiliki aktivitas enzimatis lebih yang lebih tinggi dibandingkan dengan papain presipitasi (Chaiwut dkk., 2007).

Nilai konsentrasi papain diperoleh dari hasil perkalian dengan faktor pengenceran sebesar 5 (LT8). Sampel papain sebelumnya telah didilusi dengan 0,1 M buffer fosfat pH 7 agar nilai absorbansi sampel tidak melebihi nilai absorbansi protein standar BSA. Rerata konsentrasi papain non-presipitasi dan presipitasi sebelum dikalikan dengan faktor pengenceran, yaitu $1159,4 \pm 62,5$ $\mu\text{g/mL}$ dan $1051 \pm 44,6$ $\mu\text{g/mL}$.

Enzim papain diisolasi dari dari getah kulit buah pepaya dipilih yang memiliki warna hijau tua. Papain menurut Amri & Mamboya (2012) banyak terkandung dalam buah yang belum matang dan kulit buahnya berwarna hijau tua. Papain yang diperoleh dari getah kulit buah pepaya lebih baik dibandingkan dari bagian daun dan batangnya. Papain dari getah buah pepaya memiliki kelebihan, antara lain mudah didapatkan pada proses penyadapan karena jumlahnya melimpah dan memiliki daya enzimatis yang cukup tinggi. Enzim papain yang dipreparasi dari getah buah pepaya memiliki aktivitas enzim optimum sebesar 2,469 U/mL pada suhu 50 °C (Kusumadjaja & Dewi, 2005). Enzim papain pada pH 6 dengan suhu 70 °C juga diketahui memiliki aktivitas protease yang lebih tinggi (53,25 U/mL) dibandingkan dengan neutrase (0,465 U/mL) untuk memproduksi hidrolisat kolagen (Damrongsakkul dkk., 2008).

Hasil analisis dengan *Independent-Sample T Test* ($p < 0,05$) menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan pada rerata konsentrasi hidrolisat kolagen non-*freeze dry* dan *freeze dry*. Hidrolisat kolagen non-*freeze dry* memiliki rerata konsentrasi $640,6 \pm 67,4$ $\mu\text{g/mL}$ sedangkan hidrolisat kolagen *freeze dry* memiliki rerata konsentrasi $700,2 \pm 124$ $\mu\text{g/mL}$ (Gambar 5). Hal ini menunjukkan bahwa hidrolisat kolagen dengan perlakuan non-*freeze dry* dan *freeze dry* dapat digunakan sebagai sampel untuk dianalisis lebih lanjut terkait karakterisasi kolagen. Pada umumnya, penelitian tentang ekstraksi dan karakterisasi kolagen menggunakan sampel dari hasil proses *freeze dry* atau *lyophilization*. Proses *freeze dry*

pada sampel kolagen sisik dilakukan sebelum analisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis, FTIR dan analisis kandungan asam amino (Zhang dkk., 2011; Bhagwat & Dandge, 2016). *Freeze dry* adalah proses pengeringan sampel (terlarut dalam air) yang dibekukan (fase solid) terlebih dahulu kemudian diuapkan pada kondisi *vacuum* untuk menghilangkan kandungan air. *Freeze dry* juga dapat memperpanjang waktu penyimpanan sampel protein yang rentan mengalami kerusakan akibat perubahan suhu yang terjadi selama penyimpanan (Ciurzynska & Lenart, 2011).



Gambar 5. Konsentrasi hidrolisat kolagen non-freeze dry dan freeze dry sisik ikan gabus (*C. striata*)

Prinsip uji Bradford didasarkan pada interaksi antara reagen pewarna *Coomassie brilliant blue* G-250 dengan protein dalam sampel dan ditentukan nilai absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm. Reagen pewarna tersebut pada pH asam akan spesifik berikatan dengan residu asam amino arginin, triptofan, tirosin, histidin, fenilalanin serta ikatan hidrofobik pada protein. Hasil interaksi antara reagen pewarna-protein ialah perubahan warna menjadi biru. Uji Bradford ini dapat mengukur konsentrasi total protein dengan rentang 20-2000 µg/mL.

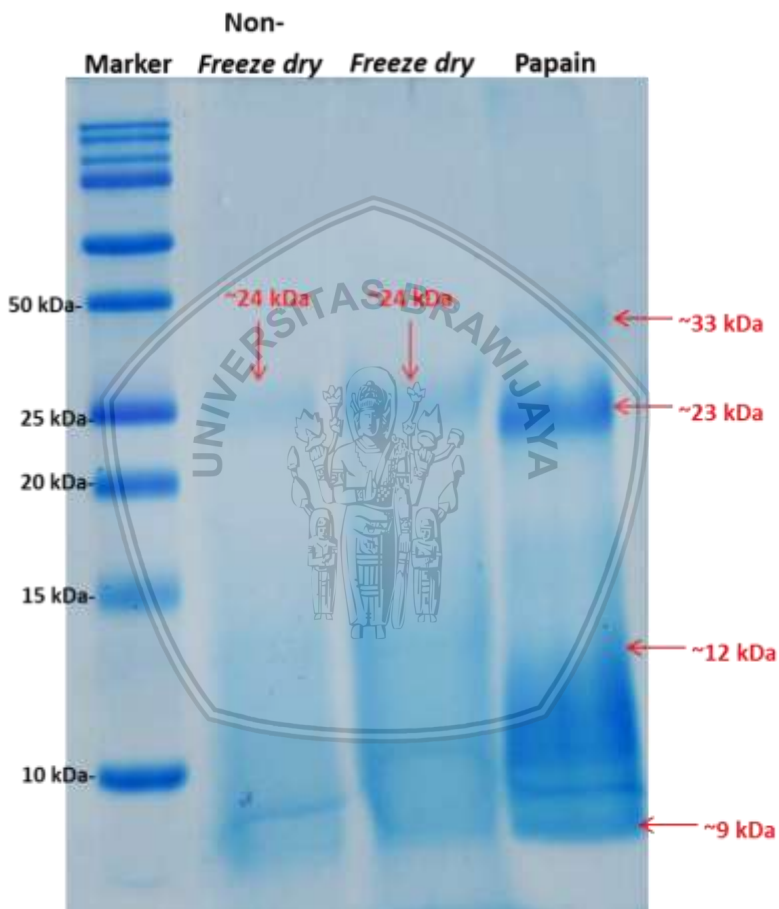
Kelebihan metode kuantitatif protein menggunakan Bradford, yaitu mudah, cepat, relatif sensitif dan dapat dilakukan pada kuvet maupun *microplate* (Nouroozi dkk., 2015; Johnson, 2017). Pembacaan nilai absorbansi uji Bradford pada penelitian ini menggunakan *microplate reader* dengan panjang gelombang 630 nm. Panjang gelombang ini berbeda dengan protokol dari Bio-Rad dan uji Bradford pada umumnya. Alternatif pembacaan absorbansi ini dapat dilakukan jika pada *microplate reader* tidak tersedia panjang gelombang 595 nm. Pembacaan nilai absorbansi pada 630 nm sesuai dengan literatur Sorensen dkk. (1999) prosedur *microtiter assays* Bradford dengan Bio-Rad menggunakan referensi panjang gelombang 600-630 nm.

4.2 Analisis Profil Peptida Kolagen dalam Hidrolisat Kolagen Sisik Ikan Gabus Berdasarkan SDS-PAGE

SDS-PAGE merupakan salah satu metode kualitatif untuk mengkarakterisasi kolagen dalam suatu sampel. Protein akan terseparasi berdasarkan berat molekulnya (BM) pada gel elektroforesis (Silva dkk., 2014). Profil suatu protein atau peptida dapat diketahui dari hasil visualisasi SDS-PAGE. Hasil menunjukkan bahwa belum tampak *band* atau pita peptida kolagen dengan berat molekul 0,3-8 kDa pada hasil SDS-PAGE dengan konsentrasi *separating* gel 15% (Gambar 6).

Hasil visualisasi SDS-PAGE pada Gambar 6 adalah sampel hidrolisat kolagen dan enzim papain non-presipitasi. Sampel papain pada analisis kualitatif ini menjadi sampel kontrol. Hasil analisis ini juga mengkonfirmasi rerata konsentrasi protein pada masing-masing sampel. Semakin tinggi konsentrasi protein sampel maka semakin tebal pula *band* yang terbentuk. *Band* yang tampak pada hidrolisat kolagen non-*freeze dry* dan *freeze dry* diduga adalah protein milik enzim papain. Berat molekul enzim papain dari getah pepaya berdasarkan literatur adalah sekitar 23,4-25 kDa (Thomas dkk., 2009; Amri & Mamboya, 2012) sedangkan chymopapain memiliki berat molekul 27-35 kDa (Pitpreecha & Damrongsakkul, 2006; Thomas dkk., 2009). Berat molekul *crude* enzim papain yang diperoleh dari hasil SDS-PAGE dalam penelitian ini, yaitu sekitar 33 kDa (chymopapain), 23-24 kDa (papain) dan *smear* pada 9-12 kDa (papain dengan berat molekul rendah). *Band* yang tampak *smear* dapat terbentuk disebabkan oleh sebagian protein dalam sampel telah terdegradasi dan adanya kontaminasi karbohidrat. Sehingga untuk

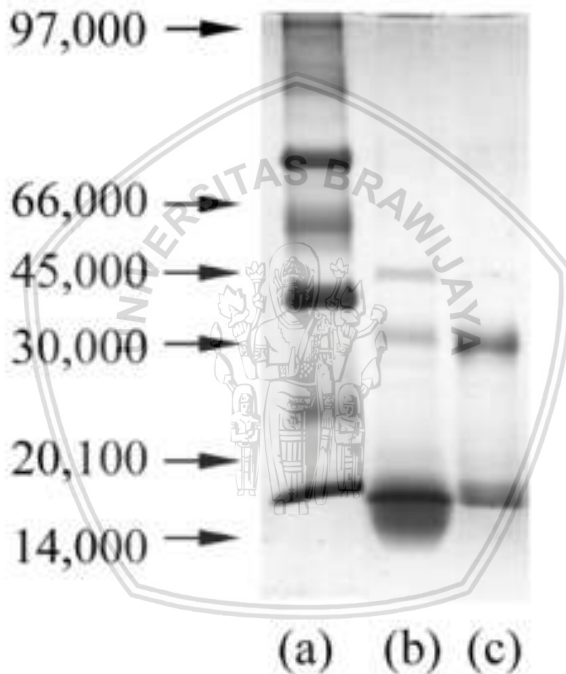
meminimalisir degradasi protein maka sampel protein tidak boleh berada di suhu ruang terlalu lama, sedangkan untuk menghindari kontaminan non-protein dapat dilakukan melalui presipitasi sampel dengan *Trichloroacetic Acid* (TCA) (Mdfenko, 2013).



Gambar 6. Hasil visualisasi SDS-PAGE sampel hidrolisat kolagen dan enzim papain dengan *separating* gel 15%

Crude papain pada penelitian Pitpreecha & Damrongsakkul (2006) yang diisolasi dari getah buah pepaya lokal juga memiliki tiga

jenis berat molekul yang berbeda. Berdasarkan hasil visualisasi dengan SDS-PAGE konsentrasi *separating* gel 12,5%, protein dalam sampel *crude* papain dengan berat molekul 35 kDa teridentifikasi sebagai chymopapain dan 21 kDa teridentifikasi sebagai papain. Protein dalam *crude* papain dengan berat molekul paling rendah yaitu 14 kDa tampak membentuk *band* tipis pada gel poliakrilamida, yang mana sejajar dengan berat molekul dari papain komersil (Gambar 7).



(Pitpreecha & Damrongsakkul, 2006)

Gambar 7. Analisis SDS-PAGE penelitian Pitpreecha & Damrongsakkul. Keterangan: (a) *low molecular weight* marker, (b) *crude* enzim papain dan (c) papain komersil

Band yang tampak pada kedua sampel hidrolisat kolagen teridentifikasi sebagai papain sedangkan *band* yang teridentifikasi sebagai chymopapain (33 kDa) tidak tampak pada sampel hidrolisat.

Berat molekul chymopapain pada penelitian ini berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh Pitpreecha & Damrongsakkul (2006), dikarenakan perbedaan konsentrasi gel poliakrilamida dan *mobility rate* yang mempengaruhi persamaan regresi dalam menentukan berat molekul.

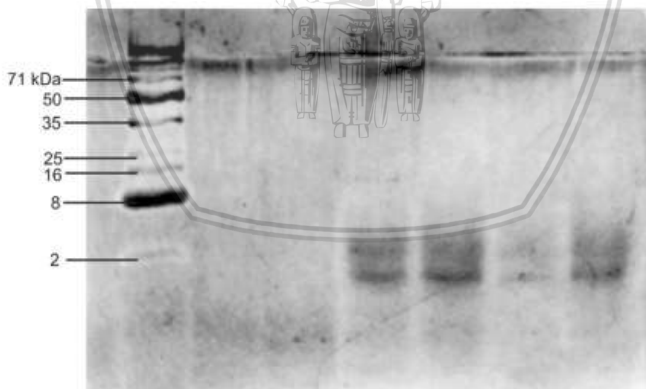
Ekstraksi kolagen secara enzimatis melibatkan proses yang disebut dengan hidrolisis protein. Hidrolisis protein menurut Rutherford & Gilani (2009) yaitu proses pemecahan ikatan peptida yang menghubungkan antar asam amino dalam protein. Tujuannya untuk mendapatkan peptida yang memiliki asam amino tertentu dengan berat molekul yang lebih kecil dari *native* proteinnya. Hidrolisis protein salah satunya dapat dilakukan dengan hidrolisis enzimatis. Hidrolisis protein secara enzimatis memiliki keuntungan, yaitu kondisinya mudah dikendalikan dan lebih spesifik dalam pemecahan ikatan peptida (Villamil dkk., 2017). Peptida kolagen dapat diperoleh dari hidrolisis enzimatis menggunakan enzim protease (Manikkam dkk., 2016).

Peptida kolagen dalam hidrolisat kolagen sisik ikan gabus (*C. striata*) pada penelitian saat ini diduga telah terhidrolisis oleh enzim papain. Proses ekstraksi kolagen oleh enzim dengan suhu optimum 50°C menyebabkan papain dalam sampel hidrolisat bekerja lebih aktif untuk menghidrolisis substrat kolagen. Hal ini dapat dibuktikan dari residu sisik yang sudah tidak terlihat dalam hidrolisat setelah diinkubasi selama 3 jam dengan *crude* papain. Sisik ikan gabus yang larut dalam *crude* papain menandakan bahwa enzim papain telah bekerja untuk menghidrolisis kolagen dalam sisik. Enzim papain memiliki sisi pemotongan pada ikatan peptida di beberapa asam amino, meliputi arginin, lisin, histidin, glisin, asam glutamat, glutamin, leusin dan tirosin (Muruges Babu, 2013). Sementara residu asam amino glisin, asam glutamat, arginin, lisin dan leusin jumlahnya melimpah pada kolagen sisik ikan (Nagai dkk., 2004). Dengan demikian, ekstraksi kolagen dengan enzim papain dapat menghasilkan potongan peptida yang sangat kecil. Pori-pori yang terbentuk pada gel SDS-PAGE konsentrasi 15 % dalam penelitian ini masih cukup besar, sehingga peptida dengan berat molekul di bawah 10 kDa diduga masih dapat lolos dan tidak tertangkap fragmen proteinnya dalam gel.

Enzim papain menurut literatur tidak hanya memotong bagian telopeptida (*non-helix*) tetapi juga bagian tropokolagen (*triple helix*) (Ramachandran, 1976). Pada penelitian lain, enzim papain juga

diketahui memiliki aktivitas protease yang sangat kuat pada proses ekstraksi kolagen. Kolagen yang dihidrolisis menggunakan asam dan enzim papain pada penelitian lain, menghasilkan potongan-potongan *band* kolagen yang lebih besar pada hasil SDS-PAGE sampel kolagennya. Pada hasil visualisasi SDS-PAGE, tidak diperoleh komponen β seperti pada sampel kolagen tanpa perlakuan hidrolisis dengan enzim papain (Jamilah dkk., 2013). Berdasarkan hasil tersebut maka diperlukan modifikasi metode ekstraksi enzimatis dengan mengontrol parameter, meliputi suhu, pH, konsentrasi enzim dan lama waktu inkubasi sampel (hidrolisis).

Peptida kolagen dalam penelitian Hema dkk. (2017) berhasil diperoleh dari proses ekstraksi enzimatis menggunakan enzim pepsin, papain dan protease pankreas dari *bovine*. Peptida kolagen hasil hidrolisis enzimatis pada penelitiannya memiliki berat sekitar 2 kDa (Gambar 8). Hasil penelitian tersebut mengindikasikan bahwa hidrolisis dengan kombinasi tiga jenis protease yang berbeda dapat memotong ikatan peptida dengan baik dan menghasilkan peptida kolagen dengan berat molekul yang lebih rendah.



(Hema dkk., 2017)

Gambar 8. Peptida kolagen dengan berat molekul 2 kDa

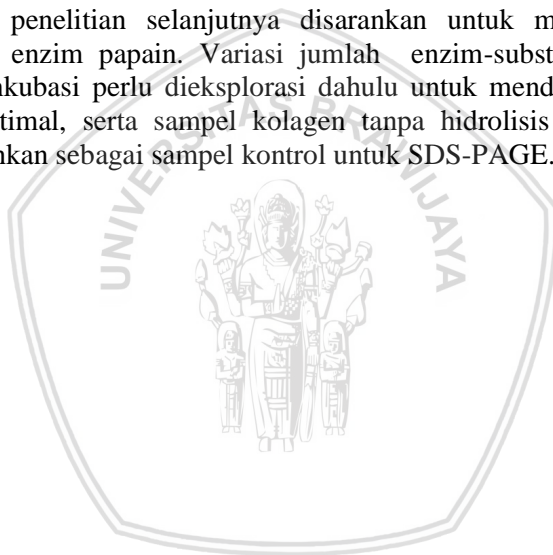
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Profil peptida kolagen dalam hidrolisat kolagen sisik ikan gabus hasil ekstraksi menggunakan enzim papain memiliki BM <10 kDa pada penelitian ini.

5.2 Saran

Pada penelitian selanjutnya disarankan untuk melakukan uji aktivitas enzim papain. Variasi jumlah enzim-substrat dan lama waktu inkubasi perlu dieksplorasi dahulu untuk mendapatkan hasil yang optimal, serta sampel kolagen tanpa hidrolisis enzim perlu ditambahkan sebagai sampel kontrol untuk SDS-PAGE.



DAFTAR PUSTAKA

- Amri, E. & F. Mamboya. 2012. Papain, a plant enzyme of biological importance: a review. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*. 8(2): 99-104.
- Bhagwat, P.K. & P.B. Dandge. 2016. Isolation, characterization and valorizable applications of fish scale collagen in food and agriculture industries. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 1-24.
- Bio-Rad. 2017. **Quick start bradford protein assay. Instruction manual. Catalog number 500-0201**. Bio-Rad Laboratories, Inc. California.
- Budirahardjo, R. 2010. Sisik ikan sebagai bahan yang berpotensi mempercepat proses penyembuhan jaringan Lunak Rongga Mulut, Regenerasi Dentin Tulang Alveolar. *Stomatognatic*. 7 (2): 136-140.
- Chai, Huey-Jine, Li, Jing-Hua, Huang, Han-Ning, Li, Tsung-Lin, Chan, Yi-Lin, Shiau, Chyuan-Yuan & Wu, Chang-Jer. 2010. Effects of sizes and conformations of fish-scale collagen peptides on facial skin qualities and transdermal penetration efficiency. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 1-9.
- Chaiwut, P., S. Nitsawang., L. Shank & P. Kanasawud. 2007. A comparative study on properties and proteolytic components of papaya peel and latex proteases. *Chiang Mai J. Sci.* 34(1): 109-118.
- Ciurzynska, A. & A. Lenart. 2011. Freeze drying-application in food processing and biotechnology-a review. *Polish Journal of Journal of Food and Nutrition Sciences*. 61(3): 165-171.
- Damrongsakkul, S., K. Ratanathammapan, K. Komolpis & W. Tanthapanichakoon. 2008. Enzymatic hydrolysis of rawhide using papain and neutrase. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 14: 202-206.
- Duan, R. J. Zhang, X. Du, X. Yao & K. Konno. 2009. Properties of collagen from skin, scale and bond of carp (*Cyprinus carpio*). *Food chemistry*. 112: 702-706.
- Dubey, V.K., M. Pande, B.K. Singh & M.V. Jagannadham. 2007. Papain-like proteases: Applications of their inhibitors. *Fricn Journal of Biotechnology*. 6(9): 1077-1086.

- Fernandez-Lucaz, J., D. Castaneda & D. Hormigo. 2017. New trends for a classical enzyme: Papain, a biotechnological success story in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*. 68: 91-101.
- Fuadi, M., H. Santoso & A. Syauqi. 2017. Uji kandungan albumin ikan gabus (*Channa striata*) dalam perbedaan lingkungan air. *Biosaintropis*. 3(1): 23-30.
- Fu, Y., M. Therkildsen, R.E. Aluko & R. Lametsch. 2018. Exploration of collagen recovered from animal by-products as a precursor of bioactive peptides: Successes and challenges. *Critical Reviews In Food Science And Nutrition*. 1-17.
- Gelse, K., E. Poschl & T. Aigner. 2003. Collagens-structure, function and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 55: 1531-1546.
- Gomez-Guillen, M.C., B. Gimenez, M.E. Lopez-Caballero & M.P. Montero. 2011. Functional and bioactive properties of collagen and gelation from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids*. 25: 1813-1827.
- Hayes, M. 2011. **Marine bioactive compounds: Sources, characterization and applications**. Springer Science & Business Media. New York.
- Hema, G.S., C.G. Joshy, K. Shyni, N.S. Chatterjee, G. Ninan & S. Mathew. 2017. Optimization of process parameters for the production of collagen peptides from skin (*Epinephelus malabaricus*) using response methodology and its characterization. *J Food Sci Technol*. 54(2): 488-496.
- Hullikere, M.M., C.G. Joshi, R. Vijay & M. Mahesh. 2014. Comparative analysis of papain from different varieties of papaya plant latex. *International Journal of Agricultural and Food Science*. 4(4): 123-127.
- Ikoma, T., H. Kobayashi, J. Tanaka, D. Walsh & S. Mann. 2003. Physical properties of type I collagen extracted from fish scales of *Pagrus major* and *Oreochromis niloticas*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 32: 199-204.
- Iltchenco, S., A.P. Kempka & R.C. Prestes. 2017. Profiles of enzymatic hydrolysis of different collagens and derivatives over time. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*. 11(1): 2165-2185.

- Jamilah, B., M.R. Umi Hartina, D. Mat Hashim & A.Q. Sazili. 2013. Properties of collagen from barramundi (*Lates calcarifer*) skin. *International Food Research Journal*. 20(2): 835-842.
- Johnson, M. 2017. Protein Quantitation. <https://www.labome.com/method/Protein-Quantitation.html>. Diakses 22 April 2018.
- Kim, S. 2013. **Marine proteins and peptides: biological activities and applications**. John Wiley & Sons, Ltd. Chichester.
- Kusumadjaja, A.P. & R.P. Dewi. 2005. Penentuan kondisi optimum enzim papain dari pepaya burung varietas jawa (*Carica papaya*). *Indo. J. Chem*. 5(2): 147-151.
- Liu, D., X. Zhang, T. Li, H. Yang, H. Zhang, J.M. Regenstein & P. Zhou. 2015. Extraction and characterization of acid and pepsin soluble collagens from the scales, skins and swim bladders of grass carp *Ctenopharyngodon idella*. *J. Food Bioscience*. 9:68-74.
- Manikkam, V., M.L., Mathai, W.A. Street, O.N. Donkor & T. Vasiljevic. 2016. Biofunctional and physicochemical properties of fish scales collagen-derived protein powders. *International Food Research Journal*. 23(4): 1614-1622.
- Mdfenko. 2013. Smear in SDS PAGE. <http://www.protocol-online.org/biology-forums-2/posts/29865.html>. Diakses 1 Juli 2018.
- Mocan, E., O. Tagadiuv & V. Nacu. 2011. Aspects of collagen isolation procedure. *Clinical Research Studies*. 2(320): 3-5.
- Muruges Babu, K. 2013. **Silk, processing, properties and applications**. Woodhead Publishing Limited. New Delhi.
- Nagai, T., M. Izumi & M. Ishii. 2004. Fish scale collagen. Preparation and partial characterization. *International Journal of Food Science and Technology*. 39: 239-244.
- Noomhorm, A., I. Ahmad & A.K. Anal. 2014. **Functional foods and dietary supplements: Processing effects and health benefits**. Wiley & Sons, Ltd. Chichester.
- Nouroozi, R.V., M.V. Noroozi & M. Ahmadizadeh. 2015. Determination of protein concentration using bradford microplate protein quantification assay. *International Electronic Journal of Medicine*. 4(1): 11-17.
- Pitpreecha, S. & S. Damrongsakkul. 2006. Hydrolysis of raw hide using proteolytic enzyme extracted from papaya latex. *Korean J. Chem. Eng*. 23(6): 972-976.

- Ramachandran, G.N. 1976. **Biochemistry of collagen**. Plenum Press. New York.
- Regenstein, J.M., M.M. Chaudry & C.E. Regenstein. 2003. The kosher and halal food laws. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2:111-117.
- Roche. 2017. Lab FAQs. Find a Quick Solution. 3rd Edition. www.roche-applied-science.com. Diakses 10 April 2018.
- Roy Choudhury, A.K. 2011. **Handbook of textile and industrial dyeing: Principles, process and types of dyes**. Woodhead Publishing. Philadelphia.
- Rutherford, S.M. & G.S. Gilani. 2009. Amino acid analysis. *Current Protocols in Protein Science*. 58(1): 11.9.1-11.9.37.
- Setyowati, H. & W. Setyani. 2015. Potensi nanokolagen limbah sisik ikan sebagai *cosmeceutical*. *Jurnal Farmasi Sains dan Komunitas*. 12(1): 30-40.
- Shoulders, M.D. & R.T. Raines. 2009. Collagen structure and stability. *Annu Rev Biochem*, 78: 929-958.
- Sibilla, S., M. Godfrey, S. Brewer, A. Budh-Raja & L. Genovese. 2015. An overview of the beneficial effects of hydrolysed collagen as a nutraceutical on skin properties: scientific backround and clinical studies. *The Open Nutraceuticals Journals*, 8: 29-42.
- Silva, T.H., J. Moreira-Silva, A.L.P. Marques, A. Domingues, Y. Bayon & R.L. Reis. 2014. Marine origin collagens and its potential applications. *Marine Drugs*. 12: 5881-5901.
- Silvipriya, K.S., K.K. Kumar, A.R. Bhat, B.D. Kumar, A. John & P. Lakshmanan. 2015. Collagen: Animal sources and biomedical application. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 5(3): 123-127.
- Sionkowska, A. & J. Kozłowska. 2014. Fish scales as biocomposite of collagen and calcium salts. *Key Engineering Materials*. 587: 185-190.
- Sorensen, H. S. Sorensen, C. Bjerregard & S. Michaelsen. 1999. **Chromatography and capillary electrophoresis in food analysis**. The Royal Society of Chemistry. Cambridge.
- Thomas, Galindo-Estrellaa, R. Hernandez-Gutierrez, J. Mateos-Diaz, G. Sandoval-Fabian, L. Chel-Guerro, I. Rodriguez-Buenfil & S. Gallegos-Tintore. 2009. Proteolytic activity in enzymatic extracts from *Carica papaya* L. cv. Maradol harvest by-products. *Process Biochemistry*. 44:77-82.

- Venkatesan, J., S. Anil, S. Kim & M.S. Shim. 2017. Marine fish protein and peptides for cosmeceuticals: A review. *Mar Drugs*. 15: 143.
- Villamil, O., H. Vaquiro & J.F. Solanilla. 2017. Fish viscera protein hydrolysates: Production, potential applications and functional and bioactive properties. *Food Chemistry*. 224: 160-171.
- Wulandari, P. Suptijah & K. Tarman. 2015. Efektivitas *pretreatment* alkali dan hidrolisis asam asetat terhadap karakteristik kolagen dari kulit ikan gabus. *JPHPI*. 18(3): 287-302.
- Zhang, Z., G. Li & B. Shi. 2005. Physicochemical properties of collagen, gelatin and collagen hydrolysate derived from bovine limed split wastes. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*. 90: 23-28.
- Zhang, F., A. Wang, Z. Li, S. He & L. Shao, 2011. Preparation and characterisation of collagen from freshwater fish scales. *Food and Nutrition Sciences*. 2: 818-823.

