

**PENGARUH PERBEDAAN RASIO KULIT IKAN LENCAM (*Lethrinus lentjan*)
DENGAN ASAM ASETAT DAN LAMA WAKTU EKSTRAKSI TERHADAP
RENDEMEN SERTA KARAKTERISTIK KOLAGEN**

SKRIPSI

Oleh:

MOH. DWI PRATOMO

NIM. 155080300111007



**PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019**

**PENGARUH PERBEDAAN RASIO KULIT IKAN LENCAM (*Lethrinus lentjan*)
DENGAN ASAM ASETAT DAN LAMA WAKTU EKSTRAKSI TERHADAP
RENDEMEN SERTA KARAKTERISTIK KOLAGEN**

SKRIPSI

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Meraih Gelar Sarjana Perikanan
di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan
Universitas Brawijaya**

Oleh:

MOH. DWI PRATOMO

NIM. 155080300111007



**PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

MALANG

2019

SKRIPSI

**PENGARUH PERBEDAAN RASIO KULIT IKAN LENCAM (*Lethrinus lentjan*)
DENGAN ASAM ASETAT DAN LAMA WAKTU EKSTRAKSI TERHADAP
RENDEMEN SERTA KARAKTERISTIK KOLAGEN**

Oleh:

MOH. DWI PRATOMO

NIM. 155080300111007

Telah dipertahankan didepan penguji
Pada tanggal 9 Oktober 2019
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Dosen Pembimbing 1

Dr. Sc. Asep Awaludin P., S.Pi, MP

NIP. 19810602 200604 1 001

Tanggal: **22 OCT 2019**

Menyetujui,

Dosen Pembimbing 2

Abdul Aziz Jaziri, S.Pi, M.Sc

NIK. 20160786 0119 1 001

Tanggal: **22 OCT 2019**

Mengetahui:

Ketua Jurusan Manajemen Sumberdaya Perairan



Dr. Ir. Muhamad Firdaus, MP

NIP. 19680919 200501 1 001

Tanggal: **22 OCT 2019**



IDENTITAS TIM PENGUJI

Judul : **PENGARUH PERBEDAAN RASIO KULIT IKAN LENCAM (*Lethrinus lentjan*) DENGAN ASAM ASETAT DAN LAMA WAKTU EKSTRAKSI TERHADAP RENDEMEN SERTA KARAKTERISTIK KOLAGEN**

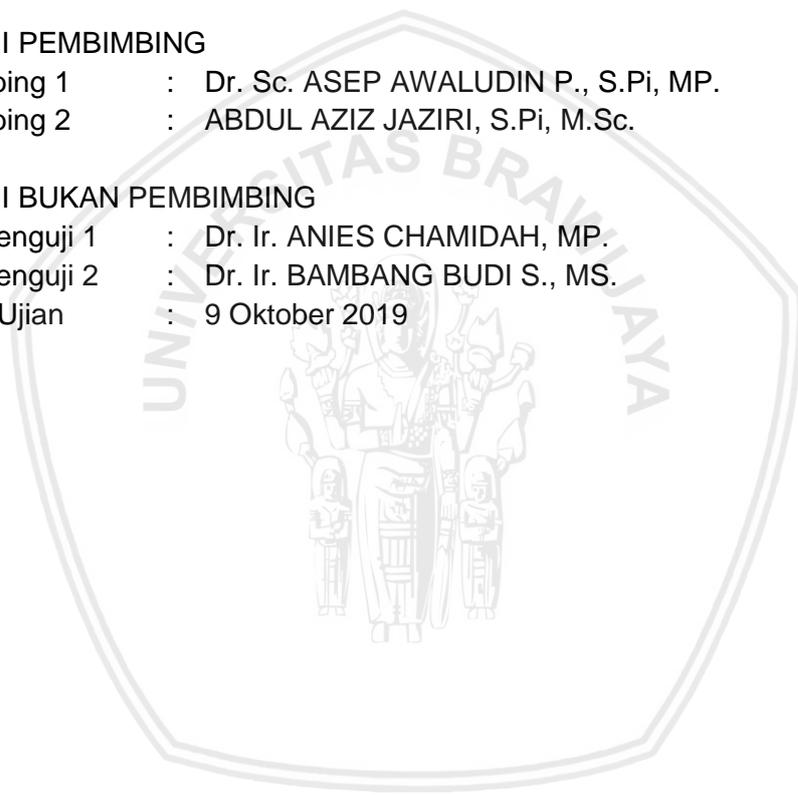
Nama Mahasiswa : MOH. DWI PRATOMO
NIM : 155080300111007
Program Studi : Teknologi Hasil Perikanan

PENGUJI PEMBIMBING

Pembimbing 1 : Dr. Sc. ASEP AWALUDIN P., S.Pi, MP.
Pembimbing 2 : ABDUL AZIZ JAZIRI, S.Pi, M.Sc.

PENGUJI BUKAN PEMBIMBING

Dosen Penguji 1 : Dr. Ir. ANIES CHAMIDAH, MP.
Dosen Penguji 2 : Dr. Ir. BAMBANG BUDI S., MS.
Tanggal Ujian : 9 Oktober 2019



PERNYATAAN ORISINALITAS

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi saya yang berjudul Pengaruh Perbedaan Rasio Kulit Ikan Lencam (*Lethrinus lentjan*) dengan Asam Asetat dan Lama Waktu Ekstraksi terhadap Rendemen serta Karakteristik Kolagen merupakan hasil karya saya sendiri dan sepanjang sepengetahuan saya tidak terdapat karya yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali yang tertulis dalam naskah ini dan dalam daftar pustaka.

Apabila kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil penjiplakan (plagiasi), maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut, sesuai hukum yang berlaku di Indonesia.

Malang, 14 Oktober 2019

Mahasiswa

Moh. Dwi Pratomo
NIM. 155080300111007

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Allah SWT atas karunia dan kesehatan yang diberikan selama ini sehingga laporan skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik.
2. Orang tua penulis yang telah mendukung dan memberikan doa dalam penyelesaian laporan skripsi ini.
3. Saudara dan keluarga penulis yang telah mendukung dan memberikan doa dalam penyelesaian laporan skripsi ini.
4. Prof. Dr. Ir. Happy Nursyam, MS, selaku dekan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya.
5. Dr. Sc. Asep Awaludin P., S.Pi, MP selaku dosen pembimbing skripsi.
6. Abdul Aziz Jaziri, S.Pi, M.Sc selaku dosen pembimbing skripsi.
7. Dr. Ir. Anies Chamidah, MP selaku dosen penguji skripsi.
8. Dr. Ir. Bambang Budi S., MS selaku dosen penguji skripsi.
9. Bapak dan Ibu Dosen Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang.
10. Segenap tim *Bio-Seafood Research Group* yang telah mendukung dan banyak membantu dalam penyelesaian laporan skripsi ini.
11. Sabrina, Cicaf, Ayuning dan Restu selaku teman satu tim dalam kegiatan penyelesaian laporan skripsi ini.
12. Segenap Tim bimbingan Pak Aziz Super yang telah bekerja sama dalam penyelesaian laporan skripsi ini.
13. Semua laboran Laboratorium FPIK UB, Laboratorium Biomedik dan Instrumentasi serta SIG Bogor.
14. Resepsionis FPIK yang selalu dilibatkan dalam peminjaman fasilitas kunci gedung dan laboratorium.
15. Keluarga besar Teknologi Hasil Perikanan yang telah mendukung dan memberikan doa dalam penyelesaian laporan skripsi ini.



RINGKASAN

MOH. DWI PRATOMO. Laporan Skripsi tentang Pengaruh Perbedaan Rasio Kulit Ikan Lencam (*Lethrinus Lentjan*) dengan Asam Asetat dan Lama Waktu Ekstraksi terhadap Rendemen serta Karakteristik Kolagen. (Dibawah bimbingan **Dr. Sc. Asep Awaludin P., S.Pi, MP** dan **Abdul Aziz Jaziri, S.Pi, M.Sc**).

Kolagen merupakan struktur protein berserat (20-30%) dari keseluruhan protein yang terdapat pada tubuh, tepatnya pada matriks ekstraseluler dan jaringan penghubung. Umumnya kolagen diproduksi dari kulit sapi dan babi. Namun, wabah penyakit hewan tertentu seperti *bovine spongiform encephalopathy* (BSE), *transmissible spongiform encephalopathy* (TSE) dan penyakit *foot and mouth diseases* (FMD) menjadi bahaya utama karena ada kemungkinan penyakit ini ditularkan ke manusia. Selain itu, bagi umat Islam produk yang berhubungan dengan babi tidak diperbolehkan. Salah satu limbah pengolahan ikan yang berpotensi dikembangkan untuk membuat kolagen adalah kulit ikan lencam (*Lethrinus lentjan*). Tujuan dari penelitian ini adalah menentukan pengaruh perbedaan rasio kulit ikan lencam dengan asam asetat dan lama waktu ekstraksi terhadap rendemen serta karakteristik kolagen.

Metode penelitian yang digunakan yaitu eksperimen pada parameter rendemen dengan analisis statistik RAL faktorial tiga ulangan yang diuji lanjut *tukey* menggunakan SPSS 25.0 dan metode deskriptif pada parameter FTIR, SDS-PAGE dan asam amino. Tahap ekstraksi kolagen menggunakan hidrolisis asam atau *Acid Soluble Collagen* (ASC). Konsentrasi asam asetat yang digunakan 0,5M rasio kuli ikan dengan asam asetat 1:10 (b/v), 1:20 (b/v) dan lama waktu ekstraksi 24 jam dan 36 jam. Setelah didapatkan rendemen, dilakukan karakterisasi yang meliputi FTIR, SDS-PAGE atau berat molekul protein dan komposisi asam amino.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa perbedaan rasio kulit ikan dengan asam asetat dan lama waktu ekstraksi berbeda nyata ($p < 0,05$) terhadap rendemen. Rata-rata rendemen terendah ditunjukkan pada perlakuan A_1B_1 rasio kulit ikan dengan asam asetat 1:10 (b/v) dan lama waktu ekstraksi 24 jam yaitu 29,89%. Rata-rata rendemen tertinggi pada perlakuan A_2B_2 rasio kulit ikan dengan asam asetat 1:20 (b/v) dan lama waktu ekstraksi 36 jam yaitu 43,06%. Analisis FTIR menunjukkan bahwa puncak-puncak serapan pada wilayah amida meliputi amida A ($3435.41-3438.56 \text{ cm}^{-1}$), amida B ($2929.67-2925.81 \text{ cm}^{-1}$), amida I ($1647.10-1649.02 \text{ cm}^{-1}$), II ($1542.95-1544.88 \text{ cm}^{-1}$) dan amida III ($1242.07-1300.37 \text{ cm}^{-1}$) yang merupakan serapan khas kolagen, pada amida I menunjukkan bahwa kolagen memiliki struktur *random coil*. Hasil SDS-PAGE menunjukkan kolagen termasuk tipe I yang terdiri dari rantai α_1 dan α_2 dengan berat molekul berkisar 100,32 – 113,34 kDa. Hasil asam amino seperti kolagen pada umunya yang identik dengan Gly-x-y, hal ini ditunjukkan oleh asam amino

yang tertinggi meliputi nilai glisin sebesar 28,19%, prolin sebesar 12,01%, arginin sebesar 11,02 %, dan alanin sebesar 10,25%.

Perbedaan rasio kulit ikan lele dengan asam asetat dan lama waktu ekstraksi berpengaruh terhadap rendemen, namun tidak berpengaruh terhadap karakteristik kolagen yang dihasilkan. Rendemen tertinggi 43,06% pada perlakuan A₂B₂. Struktur protein kolagen yang dihasilkan yaitu *random coil* dan kolagen termasuk tipe I yang terdiri dari $\alpha 1$ dan $\alpha 2$ dengan berat molekul berkisar 100,32–113,34 kDa.



KATA PENGANTAR

Asalamualaikum Wr. Wb.

Segala puji dan syukur kami panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa yang telah melimpahkan rahmat serta karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan laporan skripsi dengan judul **“Pengaruh Perbedaan Rasio Kulit Ikan Lencam (*Lethrinus lentjan*) dengan Asam Asetat dan Lama Waktu Ekstraksi terhadap Rendemen serta Karakteristik Kolagen”**. Sebagai salah satu syarat untuk meraih gelar sarjana perikanan di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang. Dibawah bimbingan Dr. Sc. Asep Awaludin P., S.Pi, MP dan Abdul Aziz Jaziri, S.Pi. M.Sc.

Penulis menyadari dalam laporan skripsi ini tentunya masih terdapat kekurangan, maka diharapkan kritik dan saran sehingga dapat menjadi pembelajaran bagi penulis. Semoga laporan skripsi ini dapat bermanfaat bagi penulis khususnya, dan bagi pembaca pada umumnya, terutama para Mahasiswa Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya.

Malang, 6 Juli 2019
Penulis,

Moh. Dwi Pratomo

DAFTAR ISI

	Halaman
IDENTITAS TIM PENGUJI	iv
UCAPAN TERIMA KASIH.....	v
RINGKASAN.....	vii
KATA PENGANTAR	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Perumusan Masalah	4
1.3 Tujuan.....	4
1.4 Hipotesis.....	4
1.5 Kegunaan	4
1.6 Tempat dan Waktu Pelaksanaan	5
2. TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 Klasifikasi Ikan Lencam (<i>Lethrinus lentjan</i>)	6
2.2 Morfologi Ikan Lencam (<i>Lethrinus lentjan</i>).....	7
2.3 Kolagen.....	8
2.3.1 Tipe Kolagen	8
2.3.2 Struktur Kolagen.....	9
2.3.3 Sumber Kolagen.....	11
2.3.4 Manfaat Kolagen.....	12
2.4 Ekstraksi Kolagen Metode Asam / <i>Acid Soluble Collagen</i>	13
2.5 Komposisi Asam Amino	15
3. METODE PENELITIAN.....	17
3.1 Materi Penelitian	17
3.1.1 Bahan	17
3.1.2 Alat.....	17
3.2 Metode Penelitian	17
3.2.1 Metode	17
3.2.2 Variabel	18
3.3 Prosedur Penelitian.....	19
3.3.1 Penelitian Tahap 1. Ekstraksi Kolagen.....	19
3.3.2 Penelitian Tahap 2. Karakterisasi Kolagen.....	22
3.4 Analisis Statistik	22
3.5 Parameter Uji	23
3.5.1 Nilai Rendemen Kolagen	23
3.5.2 Analisis FTIR	24
3.5.3 Berat Molekul (SDS-PAGE).....	24
3.5.4 Komposisi Asam Amino	25

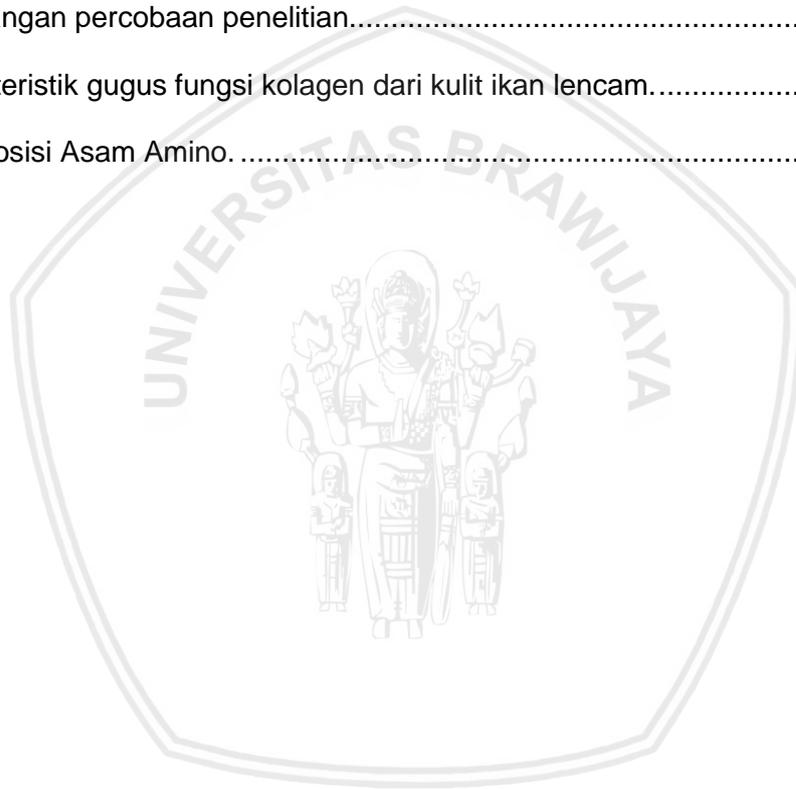


4. HASI DAN PEMBAHASAN	26
4.1 Rendemen Kolagen	26
4.2 <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> (FTIR) Kolagen.....	28
4.3 Berat Molekul (SDS-PAGE) Kolagen	32
4.4 Komposisi Asam Amino Kolagen	34
5. KESIMPULAN DAN SARAN	37
5.1 Kesimpulan	37
5.2 Saran	37
DAFTAR PUSTAKA.....	38
LAMPIRAN.....	42



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Tipe Kolagen.	9
2. Ekstraksi kolagen dengan asam asetat.....	14
3. Komposisi asam amino kolagen kulit ikan mas dan kulit anak sapi.	16
4. Rancangan percobaan penelitian.....	23
5. Karakteristik gugus fungsi kolagen dari kulit ikan lele.....	28
6. Komposisi Asam Amino.....	34

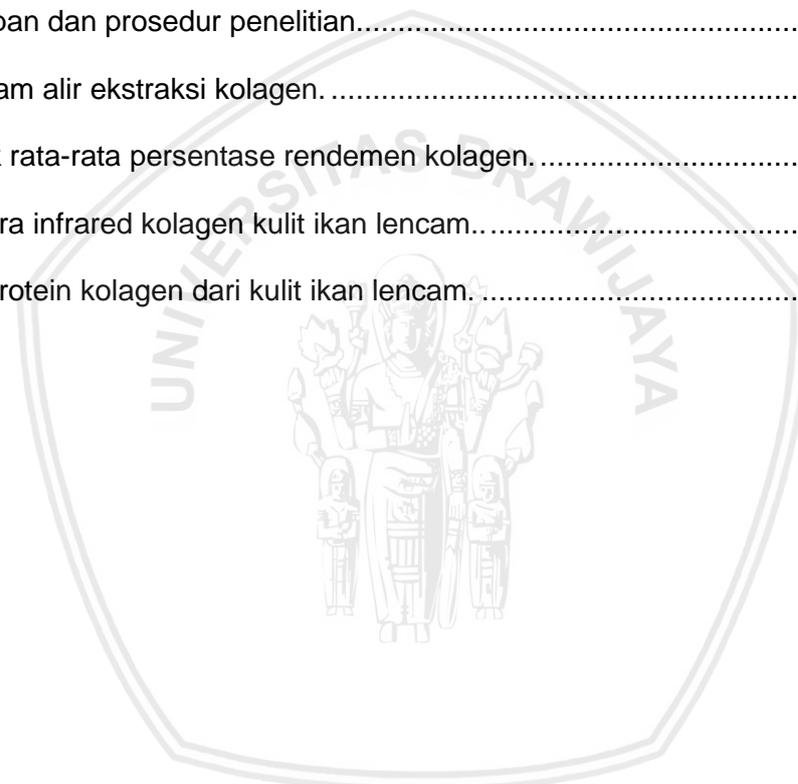


DAFTAR GAMBAR

Gambar

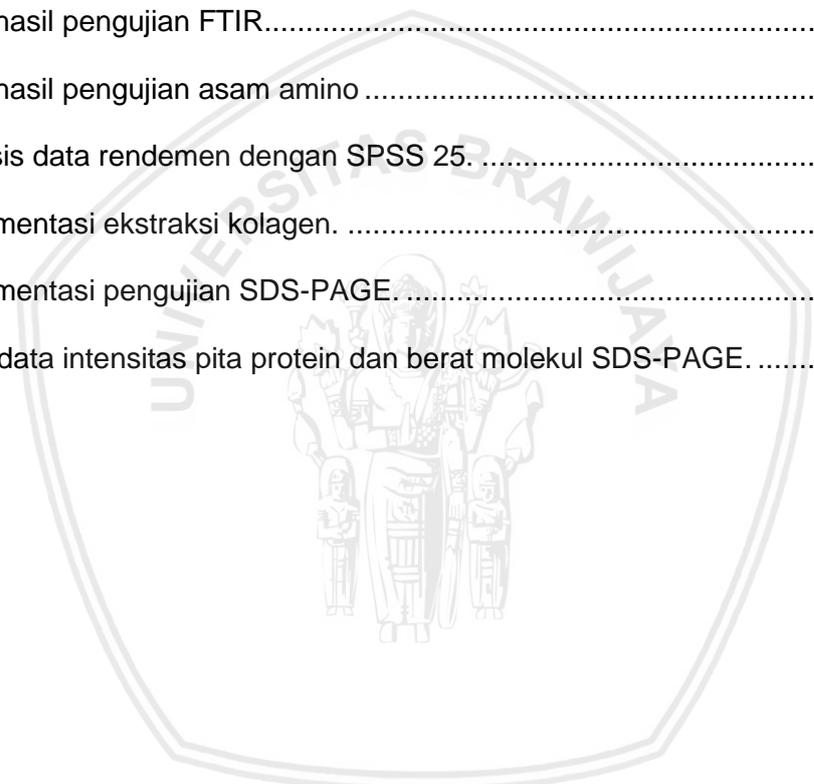
Halaman

1. Ikan Lencam	7
2. Struktur molekul triple helix kolagen tipe I	10
3. Tahapan dan prosedur penelitian.....	19
4. Diagram alir ekstraksi kolagen.....	20
5. Grafik rata-rata persentase rendemen kolagen.....	26
6. Spektra infrared kolagen kulit ikan lencam.....	29
7. Pita protein kolagen dari kulit ikan lencam.....	33



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Diagram alir preparasi sampel SDS-PAGE.....	42
2. Diagram alir pengujian SDS-PAGE.....	43
3. Data rendemen.....	44
4. Data hasil pengujian FTIR.....	45
5. Data hasil pengujian asam amino.....	52
6. Analisis data rendemen dengan SPSS 25.....	55
7. Dokumentasi ekstraksi kolagen.....	57
8. Dokumentasi pengujian SDS-PAGE.....	60
9. Hasil data intensitas pita protein dan berat molekul SDS-PAGE.....	62





1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kolagen merupakan struktur protein berserat (20-30%) dari keseluruhan protein yang terdapat pada tubuh, tepatnya pada matriks ekstraseluler dan jaringan penghubung (Kittiphattanabawon *et al.*, 2005). Kolagen memegang peranan penting dalam industri biomedis, farmasi, makanan, dan kosmetik (Kim dan Mendis, 2006). Kolagen memiliki fungsi biologis dalam pembentukan jaringan dan organ serta terlibat dalam pembelahan, pertahanan, dan diferensiasi sel. Fungsi biologis tersebut yang menyebabkan penggunaan kolagen dalam industri, khususnya dalam bidang medis, berkembang sangat pesat. Aplikasi kolagen pada bidang farmasi banyak digunakan untuk implantasi, pengobatan kanker, dan penghantar obat (Bareil *et al.*, 2010). Pemanfaatan kolagen dalam bidang kosmetik digunakan untuk perawatan antipenuaan dini (Silva *et al.*, 2013), produk perawatan kulit dan make up dalam bentuk lotion, gel, maupun bubuk (Secchi, 2008).

Kolagen memiliki kemampuan untuk memberikan sifat elastis pada kulit dan dapat mengurangi keriput yang terjadi sebagai efek dari penuaan. Kolagen pada kosmetik jika digunakan pada kulit wajah akan mampu menahan air sehingga membuat kulit wajah tetap dalam keadaan lembab (Bareil *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2011; Secchi, 2008). Keistimewaan penggunaan kolagen berkaitan dengan sifat fisikokimia dari kolagen. Kolagen memiliki karakter yang mudah diserap dalam tubuh, memiliki sifat tidak beracun, afinitas dengan air tinggi, *biocompatible*, *biodegradable*, relatif stabil, dapat disiapkan dalam berbagai bentuk sesuai kebutuhan, dan mudah dilarutkan sehingga pemanfaatannya dalam bidang industri berkembang pesat (Lee *et al.*, 2001). *Innova Market Insights* mencatat bahwa secara global jumlah indeks peluncuran produk baru

makanan dan minuman yang mengandung kolagen mengalami kenaikan hingga 33% dalam 10 tahun terakhir (2007-2016).

Pada umumnya kolagen diproduksi dari kulit sapi dan babi (Giraud-Guille *et al.*, 2000). Namun, wabah penyakit hewan tertentu seperti *bovine spongiform encephalopathy* (BSE), *transmissible spongiform encephalopathy* (TSE) dan penyakit *foot and mouth diseases* (FMD) menjadi bahaya utama akan penggunaan kolagen hewan karena ada kemungkinan penyakit ini ditularkan ke manusia (Trevitt dan Singh 2003). Selain itu bagi umat Islam produk yang berhubungan dengan babi tidak diperbolehkan (haram) (Jongjareonrak *et al.*, 2005). Dalam hal ini diperlukan alternatif kolagen dari sumber lain yang tidak ada risiko penularan penyakit dan juga tidak ada larangan agama yaitu kolagen dari ikan. Oleh karena itu, kolagen dari limbah ikan dianggap sebagai alternatif karena ketersediaannya yang melimpah, nilai biologisnya tinggi, serta terjamin halal (Muralidharan *et al.*, 2011).

Salah satu limbah pengolahan ikan yang berpotensi dikembangkan untuk membuat kolagen adalah kulit ikan lele (*Lethrinus lentjan*). Ikan lele dikenal dengan sebutan ikan *emperor*. Ikan lele merupakan ikan target masyarakat nelayan dengan pancing dan jaring (Marsoali, 2001). Berdasarkan observasi di lapangan, tepatnya di PT. Alam Jaya Surabaya. Ikan lele biasanya diolah dalam bentuk fillet yang hanya diambil dagingnya saja, sehingga menyisakan limbah salah satunya kulit. Limbah berupa kulit ikan lele mencapai 20% atau 40-60 kg setiap harinya dan tidak ada penanganan maupun pengolahan limbah kulit ikan lele. Padahal limbah kulit ikan memiliki nilai tambah yang tinggi karena dapat digunakan sebagai bahan baku untuk pembuatan kolagen (Muralidharan *et al.*, 2011). Ikan lele memiliki ciri khas tekstur kulit yang tebal. Jika dimanfaatkan dengan baik, maka limbah kulit ikan lele berpotensi sebagai sumber kolagen yang sangat menjanjikan.

Tahap ekstraksi kolagen pada umumnya yaitu hidrolisis menggunakan enzim atau *Pepsin Soluble Collagen* (PSC) dan hidrolisis menggunakan asam atau *Acid Soluble Collagen* (ASC) (Nagai dan Suzuki, 2000). Ekstraksi dengan pepsin memiliki kelemahan yaitu pepsin komersial yang beredar di pasaran berasal dari babi sehingga tidak dapat digunakan oleh umat muslim berkaitan dengan kehalalannya, sedangkan pepsin dari sapi sulit dicari dan mahal (Muralidharan *et al.*, 2011). Umumnya kolagen larut dalam pelarut asam tetapi, pada pH yang sangat asam kelarutan menjadi sedikit menurun (Kittiphattanabawon *et al.*, 2005). Oleh karena itu, ekstraksi kolagen dilakukan dengan menggunakan asam lemah seperti asam asetat. Asam asetat memiliki kemampuan mengekstrak kolagen yang tinggi, asam asetat memiliki gugus karboksil (-COOH) yang dapat berikatan dengan gugus amina (-NH) dari protein kolagen sehingga memudahkan proses ekstraksi kolagen (Liu *et al.*, 2015).

Isolasi kolagen dari kulit ikan sudah cukup banyak dilakukan, rendemen kolagen kulit ikan menggunakan asam asetat berbeda-beda. Rendemen kolagen larut asam asetat kulit ikan *chub mackarel* sebesar 49,80% dan kulit ikan *Japanese sea-bass* sebesar 51,40% (Nagai dan Suzuki, 2000). Kulit ikan *surf smelt* (*Hypomesus pretiosus japonicus Brevoort*) yaitu sebesar 24,00% (Nagai *et al.*, 2010). Ekstraksi kolagen kulit dari *grass carp* (*Ctenopharyngodon idella*), dengan konsentrasi asam asetat dan waktu yang berbeda menunjukkan pengaruh yang signifikan pada ekstraksi kolagen yang larut dalam asam asetat. Hasil kolagen terlarut meningkat dengan meningkatnya waktu dan konsentrasi asam asetat (Wang *et al.*, 2008). Kondisi optimum untuk mendapatkan hasil kolagen tertinggi yaitu pada konsentrasi asam asetat 0,54 M dan waktu 32,1 jam. Sedangkan ekstraksi kolagen ikan dengan perbandingan rasio asam asetat yang berbeda menunjukkan pengaruh yang signifikan terhadap hasil ekstraksi kolagen kulit dari *sole fish* (*Aseraggodes umbratilis*). Kondisi optimum untuk memperoleh

hasil kolagen tertinggi yaitu konsentrasi asam asetat 0,54 M dan rasio kulit dengan pelarut 1:20 (Arumugam *et al.*, 2018).

Informasi mengenai efektivitas ekstraksi kolagen menggunakan rasio kulit ikan lencam dengan asam asetat dan lama waktu ekstraksi yang berbeda belum pernah dilaporkan, sehingga perlu dilakukan penelitian mengenai efektivitas ekstraksi kolagen dengan rasio kulit ikan lencam dengan asam asetat dan lama waktu ekstraksi. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan pengaruh rasio kulit ikan lencam dengan asam asetat dan lama waktu ekstraksi terhadap rendemen serta karakteristik kolagen kulit ikan lencam.

1.2 Perumusan Masalah

Bagaimana pengaruh perbedaan rasio kulit ikan lencam (*Lethrinus lentjan*) dengan asam asetat dan lama waktu ekstraksi terhadap rendemen serta karakteristik kolagen?

1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah menentukan pengaruh perbedaan rasio kulit ikan lencam (*Lethrinus lentjan*) dengan asam asetat dan lama waktu ekstraksi terhadap rendemen serta karakteristik kolagen.

1.4 Hipotesis

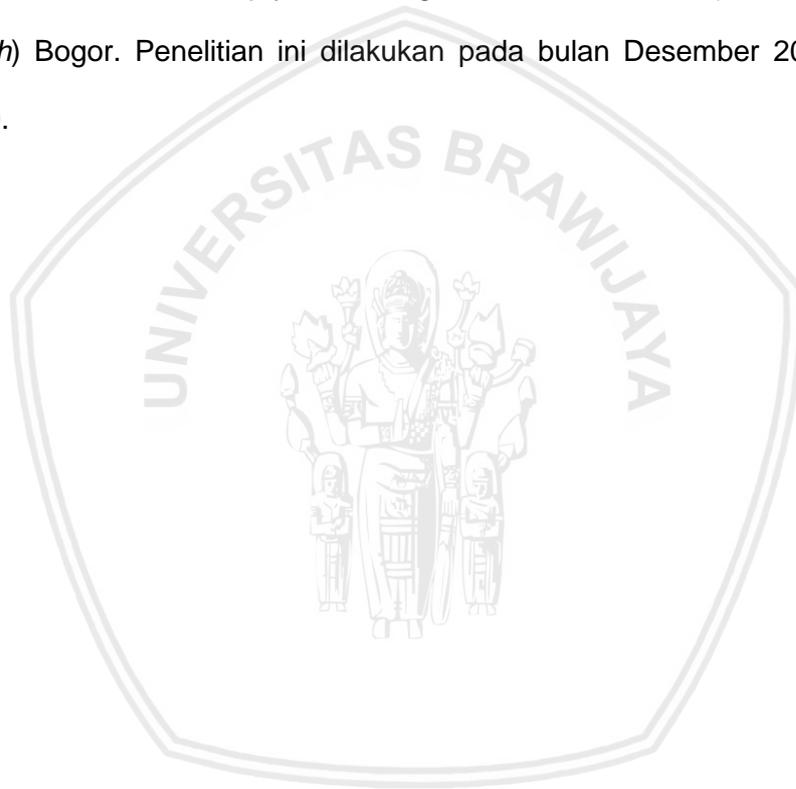
Hipotesis dari penelitian ini adalah perbedaan rasio kulit ikan lencam (*Lethrinus lentjan*) dengan asam asetat dan lama waktu ekstraksi berpengaruh terhadap rendemen serta karakteristik kolagen.

1.5 Kegunaan

Kegunaan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh perbedaan rasio kulit ikan lencam (*Lethrinus lentjan*) dengan asam asetat dan lama waktu ekstraksi terhadap rendemen serta karakteristik kolagen.

1.6 Tempat dan Waktu Pelaksanaan

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Ilmu Teknologi Hasil Perikanan divisi Perekayasaan Hasil Perikanan dan divisi Nutrisi dan Pakan Ikan, Laboratorium Budidaya Ikan divisi Penyakit dan Kesehatan Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Laboratorium Biomedik, Fakultas Kedokteran, Laboratorium Instrumentasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (MIPA), Universitas Brawijaya, Malang dan Graha SIG (*Saraswanti Indo Genetech*) Bogor. Penelitian ini dilakukan pada bulan Desember 2018 sampai Juli 2019.



2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Klasifikasi Ikan Lencam (*Lethrinus lentjan*)

Ikan lencam merupakan ikan yang tersebar di perairan pantai seluruh Indonesia, meluas dari wilayah utara sampai ke teluk Benggala, Teluk Siam, sepanjang pantai Laut Cina Selatan, ke selatan sampai ke perairan tropis Australia, ke barat sampai ke Afrika Selatan, bahkan di perairan tropis Atlantik Amerika (FAO, 2001). Salah satu daerah sebaran populasi ikan lencam di Indonesia adalah Kepulauan Seribu (Sevtian, 2012).

Ikan lencam (Gambar 1) merupakan ikan laut yang termasuk dalam famili *Lethrinidae* yang dikenal dengan sebutan ikan *emperor*. Ikan lencam salah satu jenis ikan karang yang termasuk dalam kelompok ikan target konsumsi dan memiliki nilai ekonomis penting. Klasifikasi ikan lencam menurut Marsoali (2001), adalah sebagai berikut:

Filum	: Chordata
Subfilum	: Vertebrata
Kelas	: Pisces
Subkelas	: Teleostei
Subordo	: Perciodea
Family	: Lethrinidae
Genus	: <i>Lethrinus</i>
Spesies	: <i>Lethrinus Lentjan</i>
Nama umum	: <i>emperor</i>
Nama lokal	: Drapapa (Pulau Panggang), Butila (Halmahera), Katamba, Asuan,
	Sikuda



Gambar 1. Ikan Lencam (Sevtian, 2012).

2.2 Morfologi Ikan Lencam (*Lethrinus lentjan*)

Ciri morfologi ikan lencam secara umum yaitu bentuk badan pipih, lengkung kepala atas sampai mata hampir lurus, dari mata sampai awal dasar sirip punggung agak cembung dan sirip ekor berlekuk. Kepala dan badan bagian atas hijau kecokelatan, bagian bawah terang. Badan dengan sirip yang mempunyai bercak putih, kuning atau merah muda. Sirip punggung berwarna putih dengan burik garis jingga kemerahan. Sirip anal berwarna putih dengan ujung-ujung sirip berwarna putih atau jingga. Bagian belakang operkulum dan dekat dengan sirip dada terdapat garis merah. Mulut yang tipis memanjang dengan bibir tebal (FAO, 2001).

Kisaran panjang ikan lencam di kawasan terumbu karang Kepulauan Gurraici, Kabupaten Halmahera Selatan pada kondisi terumbu karang yang masih baik dengan ukuran panjang berkisar 100-410 mm (Sevtian, 2012). Ikan lencam memiliki sirip punggung yang keras sebanyak 10 dan 9 sirip yang lemah, sirip dubur yang keras sebanyak 3 dan 8 sirip yang lemah, sirip dada yang keras sebanyak 1 dan 12 sirip yang lemah, sirip perut yang keras sebanyak 1 dan 5

sirip yang lemah, dengan jumlah sisik pada guratan sisik antara 47-48 buah (FAO, 2001).

2.3 Kolagen

Kolagen merupakan struktur protein berserat (20-30%) dari keseluruhan protein yang terdapat pada tubuh, tepatnya pada matriks ekstraseluler dan jaringan penghubung. Kolagen dapat ditemukan pada kornea, tulang, pembuluh darah, tulang rawan dan dentin gigi (Wang *et al.*, 2008). Kolagen pada manusia terdiri dari sepertiga dari total protein, menyumbang tiga perempat dari berat kering kulit dan merupakan komponen yang paling umum dari matriks ekstraseluler. Aplikasi kolagen sangat beragam dalam industri seperti kosmetik, farmasi, medis, film dan kulit. Bentuk larut kolagen memiliki manfaat dalam berbagai bidang seperti makanan dan farmasi karena karakteristiknya yang unik yaitu biodegradabilitas dan antafenites yang lemah (Ogawa *et al.*, 2004).

2.3.1 Tipe Kolagen

Berdasarkan struktur dan Pengelompokan supramolekulnya, kolagen dikategorikan ke dalam beberapa tipe, diantaranya adalah kolagen pembentuk fibril (kolagen tipe I,II,III,V dan XI), kolagen membran dasar (kolagen tipe IV), kolagen mikrofibrilar (kolagen tipe VI), kolagen penahan (kolagen tipe VII), kolagen pembentuk jaringan heksagonal (kolagen tipe VIII dan X), kolagen FACIT (kolagen tipe IX, XII, XIV, XIX, XX dan XXI), kolagen transmembran (kolagen tipe XIII, XVII), multiplexin (kolagen tipe XV, XVI dan XVIII) dan kolagen yang lain (kolagen tipe XXVIII dan XXIX) (Fenhg, 2016). Tipe-tipe kolagen menurut Soroushanova *et al.*, (2019), dapat dilihat pada Tabel 1 sebagai berikut.

Tabel 1. Tipe Kolagen.

Tipe	Kelas	Komposisi	Distribusi
I	Fibrilar	$\alpha 1[I]_2\alpha 2[I]$	Dermis, Tulang, Tendon, Ligamen
II	Fibrilar	$\alpha 1[II]_3$	Tulang Rawan, Vitreous
III	Fibrilar	$\alpha 1[III]_3$	Kulit, Pembuluh Darah, Usus
IV	Network	$\alpha 1[IV]_2\alpha 2[IV]$ $\alpha 3[IV] \alpha 4[IV] \alpha 5[IV]$ $\alpha 5[IV]_2\alpha 6[IV]$	Membran Dasar
V	Fibrilar	$\alpha 1[V]_3$ $\alpha 1[V]_2\alpha 2[V]$ $\alpha 1[V] \alpha 2[V] \alpha 3[V]$	Tulang, Dermis, Kornea, Plasenta
VI	Network	$\alpha 1[VI] \alpha 2[VI] \alpha 3[VI]^P$ $\alpha 1[VI] \alpha 2[VI] \alpha 4[VI]$	Tulang, Tulang Rawan, Kornea, Dermis
VII	Anchoring Fibrils	$\alpha 1[VII]_2\alpha 2[VII]$	Dermis, Kandung Kemih
VIII	Network	$\alpha 1[VIII]_3$ $\alpha 2[VIII]_3$ $\alpha 1[VIII]_2\alpha 2[VIII]$	Dermis, Otak, Jantung, Ginjal
IX	FACIT	$\alpha 1[IX] \alpha 2[IX] \alpha 3[IX]$	Tulang Rawan, Kornea, Vitreous
X	Network	$\alpha 1[X]_3$	Cartilage
XI	Fibrilar	$\alpha 1[XI] \alpha 2[XI] \alpha 3[XI]$	Tulang Rawan, Diskus Intervertebralis
XII	FACIT	$\alpha 1[XII]_3$	Dermis, Tendon
XIII	MACIT	$\alpha 1[XIII]_3$	Sel Endotel, Dermis, Mata, Jantung
XIV	FACIT	$\alpha 1[XIV]_3$	Tulang, Dermis, Tulang Rawan
XV	MULTIPLEXIN	$\alpha 1[XV]_3$	Kapiler, Testis, Ginjal, Jantung
XVI	FACIT	$\alpha 1[XVI]_3$	Dermis, Ginjal
XVII	MACIT	$\alpha 1[XVII]_3$	Hemidesmosom Pada Epitel
XVIII	MULTIPLEXIN	$\alpha 1[XVIII]_3$	Membran Basement, Hati
XIX	FACIT	$\alpha 1[XIX]_3$	Membran Basement
XX	FACIT	$\alpha 1[XX]_3$	Kornea
XXI	FACIT	$\alpha 1[XXI]_3$	Perut, Ginjal
XXII	FACIT	$\alpha 1[XXII]_3$	Tissue Junctions
XXIII	MACIT	$\alpha 1[XXIII]_3$	Jantung, Retina
XXIV	Fibrilar	$\alpha 1[XXIV]_3$	Tulang, Kornea
XXV	MACIT	$\alpha 1[XXV]_3$	Otak, Jantung, Testis
XXVI	FACIT	$\alpha 1[XXVI]_3$	Testis, Ovary
XXVII	Fibrilar	$\alpha 1[XXVII]_3$	Tulang Rawan
XXVIII	-	$\alpha 1[XXVIII]_3$	Dermis, Saraf Siatik
XXIX	-	$\alpha 1[XXIX]_3$	Epidermis, paru-paru, usus besar dan testis

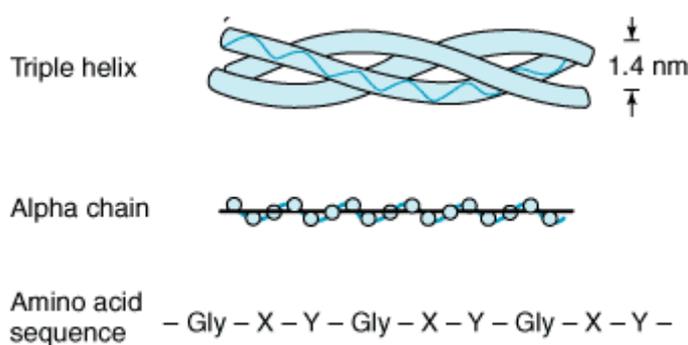
Sumber: (Sorushanova *et al.*, 2019).

2.3.2 Struktur Kolagen

Molekul kolagen sekitar 280 nm dengan massa molar 360.000 Da yang distabilkan oleh ikatan hidrogen dan ikatan antar molekul yang terdiri dari

polipeptida *triple helix* masing-masing sekitar 1000 asam amino yang disebut rantai α . Rantai menjadi terikat dan membentuk *triple helix* yang stabil yang dan bervariasi. Molekul-molekul *triple helix* memiliki domain globular yang disebut pro kolagen. Globular ini dibelah dalam berbagai derajat untuk memberikan struktur ter polimerisasi (*tropocollagen*), yang merupakan unit dasar dari kolagen. Molekul *tropocollagen* stabil karena interaksi hidrofobik dan elektrostatik (Schimdt *et al.*, 2016).

Semua *family* kolagen memiliki *triple helix* serupa yang menyusun karakteristik tiga rantai α seperti pada Gambar 2. Secara struktur *triple-helix* dapat dibuat oleh tiga rantai polipeptida identik (homotrimers) seperti pada kolagen tipe I, III, VII, X dan XI dan yang lainnya. Namun, jenis kolagen yang paling melimpah seperti tipe I, IV, V, VI, IX dan XI adalah spesies heteromer yaitu *triple helix* tangan kanan yang dibentuk oleh dua atau lebih rantai yang berbeda (heterotrimers). Domain kolagen *triple helix* dicirikan oleh glisin di setiap posisi ketiga rantai polipeptida yang menghasilkan (Gly-X-Y) n struktur berulang. Rantai α dirakit mengelilingi poros tengah sedemikian rupa sehingga semua residu glisin ditempatkan di tengah *triple helix*, sementara rantai lain yang lebih besar dari asam amino lain ditempatkan di posisi luar. Posisi X dan Y sering diisi oleh prolin dan hidroksprolin (Fenhg, 2016).



Gambar 2. Struktur molekul *triple helix* kolagen tipe I (Fenhg, 2016)

2.3.3 Sumber Kolagen

Kulit sapi dan babi adalah sumber utama industri dalam memproduksi kolagen. Mulai dari tahun 1930-an, bahan baku pertama yang digunakan untuk produksi kolagen adalah kulit babi dan hingga saat ini bahan baku yang paling signifikan untuk produksi kolagen dalam industri skala besar adalah kulit babi (Giraud-Guille *et al.*, 2000). Dilaporkan bahwa wabah penyakit hewan tertentu seperti *bovine spongiform encephalopathy* (BSE), *transmissible spongiform encephalopathy* (TSE) dan penyakit *foot and mouth diseases* (FMD) menjadi bahaya utama akan penggunaan kolagen hewan karena ada kemungkinan penyakit ini ditularkan ke manusia (Trevitt dan Singh, 2003). Selain itu bagi umat Islam produk yang berhubungan dengan babi tidak diperbolehkan (haram). Karena itu, banyak penelitian telah dilakukan untuk menemukan sumber alternatif kolagen. Sejauh ini, kolagen limbah ikan menurut Nagai dan Suzuki (2000), ditemukan memiliki karakteristik paling mirip dengan kolagen mamalia. Dengan demikian akan menarik perhatian industri sebagai sumber alternatif untuk produksi kolagen dari limbah ikan.

Dalam dekade ini, sejumlah besar spesies ikan diselidiki sebagai alternatif dari sumber kolagen yang halal, aman dan tidak berisiko tertular penyakit. Sumber kolagen dari ikan telah dilakukan di beberapa spesies menggunakan produk hasil sampingan berupa limbah yang berbeda seperti kolagen yang diekstraksi dari kulit ikan *Brownstripe red snapper* (*Lutjanus vitta*) (Jongjareonrak *et al.*, 2005); Kulit ikan *Grass carp* (*Ctenopharyngodon idella*) (Wang *et al.*, 2008); Kulit ikan *blacktip shark* (*Carcharhinus limbatus*) (Kittiphattanabawon *et al.*, 2010); Kulit *leather jacket* (*Odonus niger*) (Muralidharan *et al.*, 2011); *Sole fish skin* (*Aseraggodes umbratilis*) (Arumugam *et al.*, 2018); Kulit ikan *Red snapper* (*Lutjanus sp.*) (Zaelani *et al.*, 2019); Kulit ikan *Black ruff* (*Centrolophus niger*) (Madhuri *et al.*, 2019). Ekstraksi kolagen dari kulit ikan menurut Schimdt *et*

al., (2016), dapat dengan menggunakan hidrolisis asam atau *Acid Soluble Collagen* (ASC) dan enzim atau *Pepsin Soluble Collagen* (PSC).

2.3.4 Manfaat Kolagen

Kolagen memegang peranan penting dalam industri biomedis, farmasi, makanan, dan kosmetik (Kim dan Mendis, 2006). Kolagen memiliki fungsi biologis dalam pembentukan jaringan dan organ serta terlibat dalam pembelahan, pertahanan, dan diferensiasi sel. Fungsi biologis tersebut yang menyebabkan penggunaan kolagen dalam industri, khususnya dalam bidang medis, berkembang sangat pesat. Pemanfaatan dan aplikasi kolagen diantaranya untuk penanganan penderita hipertensi, permasalahan urinari, sakit yang berkaitan dengan *osteoarthritis*, rekayasa jaringan untuk implantasi pada manusia dan penghambatan penyakit *angiogenic*, seperti komplikasi diabetes, obesitas dan *arthritis*. Aplikasi kolagen pada bidang farmasi banyak digunakan untuk implantasi, pengobatan kanker, dan penghantar obat (Bareil *et al.*, 2010). Pemanfaatan kolagen dalam bidang kosmetik digunakan untuk perawatan antipenuaan dini, sampo, produk-produk perawatan rambut, cat kuku (Silva *et al.*, 2013), produk perawatan kulit dan make up dalam bentuk lotion, gel, maupun bubuk (Secchi, 2008).

Kolagen memiliki kemampuan untuk memberikan sifat elastis pada kulit dan dapat mengurangi keriput yang terjadi sebagai efek dari penuaan. Kolagen pada kosmetik jika digunakan pada kulit wajah akan mampu menahan air sehingga membuat kulit wajah tetap dalam keadaan lembab (Bareil *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2011; Secchi, 2008). Kolagen memiliki karakter yang mudah diserap dalam tubuh, memiliki sifat tidak beracun, afinitas dengan air tinggi, *biocompatible*, *biodegradable*, relatif stabil, dapat disiapkan dalam berbagai bentuk sesuai kebutuhan, dan mudah dilarutkan sehingga pemanfaatannya dalam bidang industri berkembang pesat (Lee *et al.*, 2001).

Kolagen diperlukan untuk memperbaiki dan membangun kembali jaringan ikat untuk mendukung perkembangan otot, kulit, dan persendian yang kuat. Kolagen juga memperkuat struktur tulang, urat, tulang rawan, dan ligamen (Kumar *et al.*, 2011; Secchi, 2008). Suplemen kolagen dapat mendorong massa otot untuk meregenerasi dan membantu lebih cepat pulih dari cedera akibat olahraga. Rematik adalah peradangan pada persendian yang bisa menyebabkan setiap pergerakan anggota gerak tubuh jadi terasa sakit dan sangat terbatas. Suplemen kolagen dapat meningkatkan kelancaran mobilitas sendi dan mengurangi rasa sakitnya (Lee *et al.*, 2001). Kolagen juga dapat dimanfaatkan dalam bidang pangan sebagai *edible casing* (Sahubawa dan Naro Putra, 2011).

2.4 Ekstraksi Kolagen Metode Asam / Acid Soluble Collagen

Salah satu cara ekstraksi kolagen adalah dengan hidrolisis menggunakan bahan kimia yaitu asam dan menggunakan enzim, namun penggunaan enzim perlu dipertimbangkan karena sulitnya mendapatkan enzim dan harganya yang cukup mahal. Hidrolisis asam dapat dilakukan dengan menggunakan asam organik seperti asam asetat, asam sitrat dan asam laktat serta asam anorganik seperti asam klorida. Namun penggunaan asam organik lebih efisien daripada asam anorganik (Skierka dan Sadowska, 2007).

Umumnya kolagen larut dalam pelarut asam, tetapi pada pH yang sangat asam kelarutan menjadi semakin sedikit menurun (Kittiphattanabawon *et al.*, 2005). Oleh karena itu ekstraksi kolagen dilakukan dengan menggunakan asam lemah dengan konsentrasi yang rendah seperti asam asetat karena asam asetat memiliki gugus karboksil (-COOH) yang dapat berikatan dengan gugus amina (-NH) dari protein kolagen sehingga memudahkan proses ekstraksi kolagen (Liu *et al.*, 2015). Beberapa penelitian ekstraksi kolagen dengan asam asetat sudah cukup banyak dilakukan, hal ini dapat dilihat pada Tabel 2 berikut ini.

Tabel 2. Ekstraksi kolagen dengan asam asetat.

Bahan Baku	Pelarut Ekstraksi	Karakterisasi	Referensi
<i>Fish skin</i>	Asam asetat 0,5M	Rendemen 51%, $\alpha 1\alpha 2$ tipe I, Td 25°C	Nagai dan Suzuki, (2000)
<i>Baltic cod (Gadus morhua)</i>	Asam asetat 0,5M	Rendemen 20%, Td 15°C	Sadowska <i>et al.</i> , (2003)
<i>Bigeye snapper (Priacanthus tayenus)</i>	Asam asetat 0,5M	Rendemen 10,94% dan 1,59%, $\alpha 1\alpha 2$ tipe I 116 kDa, pH kelarutan 2-5	Kittiphattanabawon <i>et al.</i> , (2005)
<i>Grass carp (Ctenopharyngodon idella)</i>	Asam asetat 0,2M; 0,5M; 0,8M	Optimum ekstraksi 0,5M asam asetat, suhu 24,7°C dan lama waktu 32 jam.	Wang <i>et al.</i> , (2008)
<i>Blacktip shark (Carcharhinus limbatus)</i>	Asam asetat 0,5M	Rendemen 20,01%, $\alpha 1\alpha 2$ tipe I, struktur <i>triple helix</i> , pl 6,78	Kittiphattanabawon <i>et al.</i> , (2010)
<i>Leather jacket (Odonus niger)</i>	Asam asetat 0,5M	Rendemen 46-50%, tipe I ($\alpha 1$) $2\alpha 2$, Td 30-32°C	Muralidharan <i>et al.</i> , (2011)
<i>Sole fish skin (Aseraggodes umbratilis)</i>	Asam asetat 0,4M; 0,6M; 0,8M	Rendemen 19,27%, ($\alpha 1$) 2 , $\alpha 2$ (M.W. 118, 116 kDa) dan β (M.W. 200 kDa), struktur <i>helical arrangements</i> , optimum ekstraksi 0,5M asam asetat, lama waktu 32,32 jam, rasio 8,97 mL/g, fibril tak teratur	Arumugam <i>et al.</i> , (2018)
<i>Red snapper (Lutjanus sp.)</i>	Asam asetat 0,5M	Rendemen 9,71%, asam amino dominan glisin, prolin, arginin dan alanin, gugus amida A, B, I, II, III	Zaelani <i>et al.</i> , (2019)
<i>Black ruff (Centrolophus niger)</i>	Asam asetat 0,5M	Tipe I $\alpha 1$, $\alpha 2$ dan β , amida A, B, I, II, III, fibril	Madhuri <i>et al.</i> , (2019)

Ekstraksi kolagen menggunakan asam asetat sudah sangat populer karena ekstraktibilitas yang tinggi, menurut Wang *et al.*, (2008), asam asetat dapat mempengaruhi ekstraksi kolagen dari kulit *grass carp (Ctenopharyngodon idella)*, konsentrasi asam asetat dapat mengubah nilai pH pada saat ekstraksi. Hal ini

juga diketahui bahwa nilai pH dapat mengatur kerapatan muatan protein yang memodifikasi interaksi elektrostatik dan struktur protein. Dalam penelitian ekstraksi kolagen kulit *grass carp* (*Ctenopharyngodon idella*) didapat hasil yang terbaik diperoleh dengan konsentrasi asam asetat 0,5 M. Sedangkan menurut Arumugam *et al.*, (2018), ekstraksi kolagen dari *sole fish skin* didapatkan hasil terbaik pada konsentrasi asam asetat 0,54 M, rasio kulit ikan dan asam asetat 1:20 (b/v) dan lama waktu ekstraksi 32 jam.

2.5 Komposisi Asam Amino

Asam amino berkontribusi pada stabilitas struktur *helix* kolagen. Asam amino glisin, prolin, dan hidroksiprolin adalah asam amino utama yang membentuk kolagen, dan jarang ditemukan pada protein lain kecuali kolagen dan elastin. Pada umumnya kolagen disusun atas asam amino yang dominan berupa Gly-x-y yaitu komposisi utama glisin dan x dapat berupa prolin dan y dapat berupa hidroksiprolin, alanin, arginin yang disusun berulang (Carvalho *et al.*, 2018). Kandungan asam amino dalam kolagen adalah glisin, dengan tingkat tirosin dan histidin yang rendah dan tidak mengandung triptofan dan sistein (Fengh, 2016).

Komposisi asam amino antara kolagen ikan dengan mamalia sedikit berbeda, karena komposisi asam amino mempengaruhi struktur molekul kolagen, sedangkan struktur dan konformasi kolagen mempengaruhi sifat fisik kolagen (Fengh, 2016). Sebagai acuan untuk memperkirakan komposisi asam amino dari kolagen kulit ikan mas (*Cyprinus carpio*) dibandingkan dengan komposisi asam amino dari kulit anak sapi dapat dilihat pada Tabel 3, menurut Duan *et al.*, (2009), kolagen dari kulit ikan terbukti berbeda dengan kolagen mamalia dalam komposisi asam aminonya, kolagen mamalia memiliki jumlah asam amino yang lebih tinggi.

Tabel 3. Komposisi asam amino kolagen kulit ikan mas dan kulit anak sapi.

Asam Amino	Kolagen Kulit Ikan Mas	Kolagen Kulit Anak Sapi
Aspartic acid	49	45
Threonine	24	18
Serine	35	33
Glutamic acid	76	75
Glycine	332	330
Alanine	118	119
Valine	19	21
Methionine	14	6
Isoleucine	10	11
Leucine	22	23
Tyrosine	3	3
Phenylalanine	13	3
Hydrolysine	7	-
Lysine	28	26
Histidine	5	5
Arginine	55	50
Hydroxyproline	76	94
Proline	114	121
Imino acid	190	215

Sumber: (Duan *et al.*, 2009).

Diketahui pada Tabel 3 asam amino prolin, leusin pada kulit ikan mas masing-masing 22, 114 menunjukkan lebih rendah daripada kulit anak sapi masing-masing 23,121. Asam amino glisin 332 pada kulit ikan mas lebih tinggi dari kulit anak sapi yaitu 330. Asam imono pada kuli ikan mas 190 lebih rendah dari kulit anak sapi yaitu 121 (Duan *et al.*, 2009). Kolagen yang diekstraksi dari spesies ikan memiliki profil asam amino yang serupa. Kandungan asam amino dalam kolagen dari beberapa kulit ikan berkisar antara 180-210 / 1000 residu. Misalnya pada ikan cod 154 residu (Duan *et al.*, 2009), kulit ikan kakap mata besar (*Priacanthus tayenus*) 193 residu (Kittiphattanabawon *et al.*, 2005).

3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian untuk ekstraksi kolagen dari kulit ikan lele (*Lethrinus lentjan*). Bahan baku untuk ekstraksi kolagen yaitu kulit ikan lele yang diambil dari limbah pengolahan fillet ikan di PT. Alam Jaya Surabaya, bahan kimia yang digunakan diantaranya NaOH, Asam Asetat, n-Butanol, aquades, NaCl, membran dialisis, aseton, buffer (0.5 M Tris HCl, pH 6.8, containing 4% SDS dan 20% glycerol), β -Mercaptoethanol (β -ME), Bromophenol Blue, pH buffer 4,0 dan 6,8. Bahan-bahan lain sebagai pendukung diantaranya yaitu kain katun, kertas label, tisu, benang kasar dan selotip.

3.1.2 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian untuk ekstraksi kolagen dari kulit ikan lele (*Lethrinus lentjan*) diantaranya yaitu beakerglass 1000 mL, beakerglass 500 mL, beakerglass 50 mL, gelas ukur, falcon tube, topples, sentrifuge, mikrosentrifuge, micropipet, hotplate stirer, magnetic stirer, spatula, sendok, pisau, talenan, saringan, pipet serologis, pipet volume, bola hisap, serbet, mikro pipet, eppendorf, bluetip, yellowtip, kulkas, kamera, pH meter, timbangan digital, timbangan analitik, penggaris, botol kaca dan gunting.

3.2 Metode Penelitian

3.2.1 Metode

Metode yang digunakan dalam penelitian ini yaitu metode eksperimen dan deskriptif. Metode penelitian eksperimen menurut Nazir (2005), adalah penelitian yang dilakukan dengan mengadakan manipulasi terhadap objek penelitian. Tujuan dari penelitian eksperimen adalah untuk menyelidiki ada atau tidaknya

hubungan sebab akibat tersebut dengan cara memberikan perlakuan tertentu pada beberapa kelompok eksperimen.

Metode deskriptif atau penguraian empiris adalah metode penelitian yang berdasarkan pengalaman atau pengamatan. Penelitian empiris berusaha membuktikan hipotesis dengan coba dan ralat (*trial and error*). Metode deskriptif bertujuan untuk memberikan gambaran akan sesuatu. Metode deskriptif dapat dilakukan secara kuantitatif maupun kualitatif, apabila kuantitatif maka akan digunakan materi statistik, sedangkan secara kualitatif yaitu berdasar pengamatan kemudian diukur dan digambarkan untuk membuktikan suatu permasalahan sesuai dengan apa yang menjadi objek penelitian (Frick, 2008). Metode eksperimen yaitu pada parameter rendemen dan metode deskriptif pada parameter FTIR (*Fourier Transform InfraRed*), SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis*) dan Asam Amino.

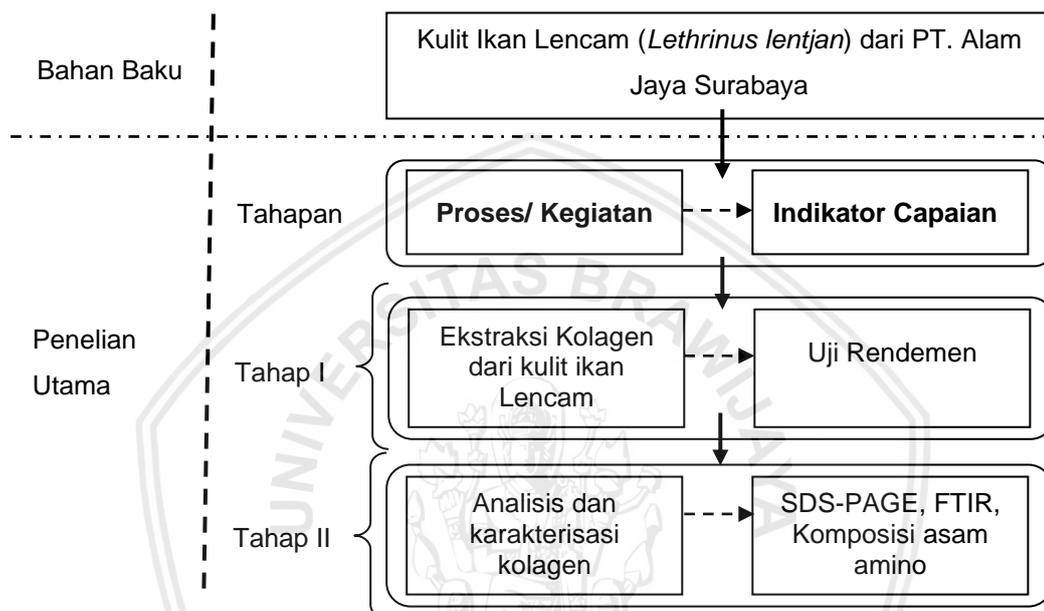
3.2.2 Variabel

Variabel adalah faktor yang mengandung lebih dari suatu nilai dalam metode statistik. Variabel terdiri dari variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas adalah faktor yang menyebabkan suatu pengaruh atau biasa disebut perlakuan yang diterapkan. Sedangkan variabel terikat adalah hasil yang diakibatkan oleh pengaruh atau variabel kontrol tersebut (Koentjaraningrat, 1993).

Variabel bebas dari penelitian ini adalah rasio kulit ikan lencam dengan asam asetat dan lama waktu ekstraksi yang digunakan untuk menghidrolisis kolagen dari kulit ikan lencam (*Lethrinus lentjan*). Sedangkan variabel terikat pada penelitian ini adalah hasil rendemen, FTIR (*Fourier Transform InfraRed*), berat molekul SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis*) dan Komposisi Asam Amino kolagen dari kulit ikan lencam (*Lethrinus lentjan*).

3.3 Prosedur Penelitian

Tahapan dan prosedur penelitian merupakan penerjemahan langkah-langkah penelitian mulai dari awal, proses dan akhir penelitian. Adapun gambaran tahapan dan prosedur penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.

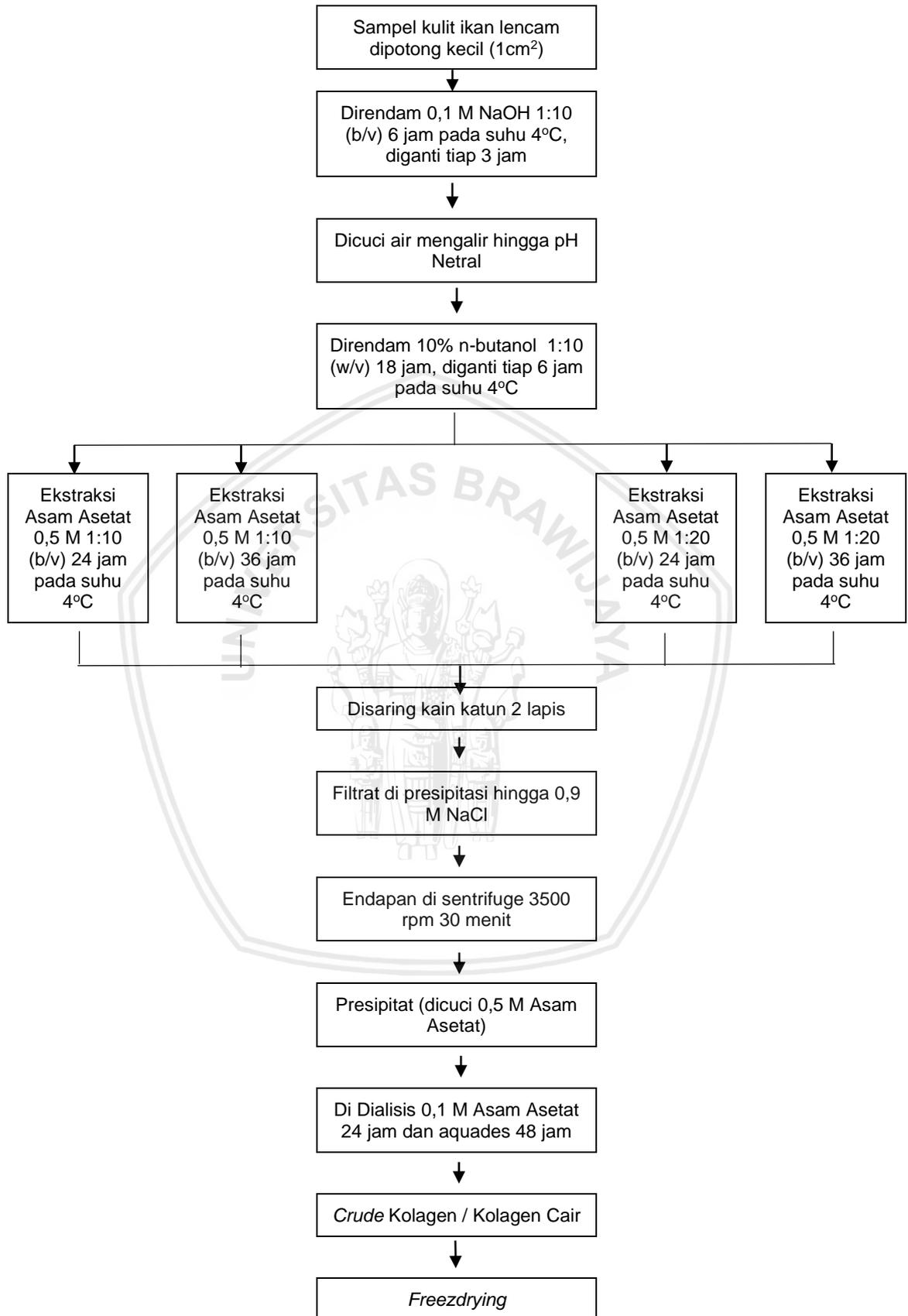


Gambar 3. Tahapan dan prosedur penelitian.

Berdasarkan tahapan dan prosedur penelitian pada Gambar 3 di atas dapat dijabarkan sebagai berikut:

3.3.1 Penelitian Tahap 1. Ekstraksi Kolagen (Kittiphattanabawon *et al.*, 2005)

Penelitian tahap 1 bertujuan untuk menganalisis dan mendapatkan ekstrak kolagen dari kulit ikan lencam (*Lethrinus lentjan*) melalui metode ekstraksi hidrolisis menggunakan asam atau *Acid Soluble Collagen* (ASC). Ekstraksi kolagen mengacu pada metode Kittiphattanabawon *et al.*, (2005), dengan sedikit modifikasi. Metode ekstraksi untuk mendapatkan kolagen terdapat dua tahapan yaitu preparasi sampel dan dilanjutkan ekstraksi kolagen menggunakan pelarut asam. Proses ekstraksi dapat dilihat pada diagram alir Gambar 4.



Gambar 4. Diagram alir ekstraksi kolagen.

A. Preparasi Sampel (Kittiphattanabawon *et al.*, 2005)

Pada tahap preparasi sampel kulit ikan lele (*Lethrinus lentjan*) dibersihkan dari sisa-sisa daging yang masih menempel, kemudian kulit dibilas dengan air mengalir lalu dipotong kecil-kecil ($\pm 1 \text{ cm}^2$) untuk memperluas permukaan. Semua tahapan dilakukan pada suhu 4°C . Kemudian untuk menghilangkan protein *non* kolagen kulit lele yang sudah dipotong kecil-kecil direndam dengan NaOH 0,1 M rasio kulit ikan dan NaOH 1:10 (b/v) selama 6 jam, sesekali dilakukan pengadukan dan larutan diganti setiap 3 jam. Kemudian sampel dicuci / dibilas dengan air mengalir hingga pH sampel netral, selanjutnya untuk menghilangkan lemak sampel direndam dengan n-butanol rasio kulit dan n-butanol 1:10 (b/v) selama 18 jam sesekali dilakukan pengadukan dan larutan diganti setiap 6 jam sekali. Kemudian sampel dicuci dengan membilas menggunakan air mengalir hingga pH sampel netral.

B. Ekstraksi Kolagen Menggunakan Asam (Kittiphattanabawon *et al.*, 2005)

Pada tahap ekstraksi sampel yang sudah di preparasi pada suhu 4°C sampel direndam menggunakan asam asetat 0,5 M rasio kulit ikan dan asam asetat 1:10 dan 1:20 (b/v) selama 24 jam dan 36 jam, sesekali dilakukan pengadukan. Kemudian dilakukan penyaringan menggunakan kain katun 2 lapis. Filtrat diambil dan dipresipitasi dengan NaCl hingga konsentrasi 0,9 M. Kemudian didiamkan hingga terbentuk endapan. Endapan yang sudah terbentuk disentrifuge 3500 rpm selama 30 menit. Lalu presipitat dicuci menggunakan asam asetat 0,5 M. Kemudian dilakukan dialisis dengan asam asetat 0,1 M selama 24 jam dan dialisis

dengan aquades selama 48 jam setiap 6 jam aquades diganti. Kemudian didapatkan *crude* kolagen atau kolagen cair.

3.3.2 Penelitian Tahap 2. Karakterisasi Kolagen

Penelitian tahap 2 bertujuan untuk menganalisis dan mengkarakterisasi kolagen dari kulit ikan lele (*Lethrinus lentjan*) yaitu dengan menganalisis hasil pengujian diantaranya nilai rendemen, FTIR, berat molekul (SDS-PAGE) dan komposisi asam amino.

3.4 Analisis Statistik

Analisis data statistik yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial menggunakan *General Linear Model Univariate* dan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) atau biasa disebut uji *Tukey HSD (Honestly Significance Difference)* dengan *software* SPSS 25.0 jumlah perlakuan yang diterapkan adalah rasio kulit dengan asam asetat (A) dan lama waktu ekstraksi kolagen (B) yang terdiri dari 4 perlakuan yaitu A_1B_1 rasio kulit dengan asam asetat 1:10 (b/v) selama 24 jam, A_1B_2 rasio kulit dengan asam asetat 1:10 (b/v) selama 36 jam, A_2B_1 rasio kulit dengan asam asetat 1:20 (b/v) selama 24 jam, dan A_2B_2 rasio kulit dengan asam asetat 1:20 (b/v) selama 36 jam.

Berdasarkan perlakuan tersebut, maka penelitian ini dirancang dengan rancangan acak lengkap (RAL) faktorial yaitu faktor pertama rasio kulit ikan dengan asam asetat dan faktor kedua adalah lama waktu ekstraksi kolagen dengan empat perlakuan dan tiga kali ulangan, sehingga jumlah satuan percobaan pada penelitian ini adalah 12 percobaan. Metode analisis yang digunakan adalah sidik ragam yang mengikuti model sebagai berikut:

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

keterangan:

Y_{ijk} = Karakterisasi kolagen yang dihasilkan.

- μ = Nilai tengah umum.
- α_i = Pengaruh taraf ke-i dari faktor (A).
- β_j = Pengaruh taraf ke-j dari faktor (B).
- $(\alpha\beta)_{ij}$ = Pengaruh interaksi taraf ke-i dari faktor A dan taraf ke-j dari faktor B.
- ϵ_{ijk} = Pengaruh sisa (galat percobaan) taraf ke-i dari faktor A dan taraf ke-k dari faktor B pada ulangan yang ke-k.

Adapun model rancangan percobaan dapat dilihat pada Tabel 4 sebagai berikut.

Tabel 4. Rancangan percobaan penelitian.

A	B	Ulangan			Total	Rata-rata
		1	2	3		
1:10	24 Jam					
	36 Jam					
1:20	24 Jam					
	36 Jam					

Keterangan perlakuan:

A : Rasio kulit ikan lencam dengan asam asetat (b/v).

B : Lama waktu ekstraksi.

Setelah data dianalisis, kemudian diinterpretasikan dengan ANOVA untuk menentukan signifikansi setiap perlakuan yang diuji cobakan pada penelitian ini. Apabila dari hasil perhitungan didapatkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) maka dilanjutkan uji beda nyata jujur atau *Tukey* untuk menentukan notasi.

3.5 Parameter Uji

Parameter uji yang dilakukan pada penelitian ekstraksi kolagen dari kulit ikan lencam (*Lethrinus lentjan*) adalah nilai rendemen, FTIR (*Fourier Transform InfraRed*), berat molekul (SDS-PAGE) dan komposisi asam amino.

3.5.1 Nilai Rendemen Kolagen (Marzuki *et al.*, 2011)

Untuk mendapatkan rendemen kolagen dapat diperoleh dengan menghitung antara berat akhir (kolagen) yang dihasilkan dengan berat awal (kulit ikan lencam). Besarnya rendemen dapat dihitung menggunakan rumus:

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat Akhir}}{\text{Berat Awal}} \times 100\%$$

3.5.2 Analisis FTIR (Singh *et al.*, 2011)

Sampel kolagen cair sebelum di FTIR dilakukan treatment terlebih dahulu dengan cara 2 mL sampel kolagen cair diuapkan kandungan airnya pada *hotplate* suhu 80°C hingga tersisa sedikit endapan, lalu didapatkan endapan kolagen murni. Kemudian analisis FTIR dilakukan menggunakan mesin FTIR *Spectrophotometer* (8400S/Shimadzu). Untuk analisis FTIR menurut Singh *et al.*, (2011), sampel kolagen yang sudah dipreparasi ditempatkan pada sel kristal dan sel dijepit pada mulut FTIR *Spectrophotometer*. Spektra dalam kisaran 400-4000 cm⁻¹ dengan penguatan sinyal otomatis dikumpulkan dalam 32 pindaian pada resolusi 4 cm⁻¹ dan dikomparasikan dengan latar belakang spektra yang direkam dari sel kosong bersih pada suhu 25°C.

3.5.3 Berat Molekul (SDS-PAGE) (Singh *et al.*, 2011)

Pengujian berat molekul *Sodium Dodecyl Sulphate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) terdapat dua tahap yaitu preparasi sampel dan pengujian sampel. Diagram alir preparasi sampel dapat dilihat pada Lampiran 1 dan diagram pengujian sampel dapat dilihat pada Lampiran 2. Sampel kolagen cair dipresipitasi sesuai metode *Thermo Scientific* sebelum di SDS dengan cara 200 µl sampel kolagen cair ditambahkan 800 µl aseton dingin suhu -20°C dalam *ependorf*, lalu di inkubasi selama 60 menit pada suhu -20°C. Kemudian disentrifuge dingin suhu -4°C menggunakan *microsentrifuge* selama 10 menit pada 11.000 rpm, lalu buang supernatan sehingga tersisa pelet protein. Kemudian biarkan sisa aseton menguap pada suhu ruang dengan membuka tutup *ependorf* selama 30 menit kemudian untuk melarutkan pelet protein ditambahkan buffer 20 µl lalu dihomogenkan.

SDS-PAGE dilakukan mengikuti metode Singh *et al.*, (2011), sampel yang sudah dilarutkan ditambah buffer sampel (0,5 M Tris HCl, pH 6,8, mengandung 4% SDS dan 20% gliserol) yang mengandung 10% β -ME.) dengan perbandingan 1:1 (v/v). Campuran dipanaskan dalam air mendidih selama 2 menit. Sampel (15 μ l protein) dimasukkan kedalam gel poliakliramida yang terdiri dari 7,5% *separating gel* dan 4% *stacking gel*. Lalu dilakukan elektroforesis pada arus konstan 15 mA selama 1 jam 30 menit menggunakan unit mini protein II (*Bio-Rad Laboratories, Inc., Richmond, CA, USA*). Setelah elektroforesis, gel diwarnai dengan 0,05% (w/v) *Coomassie blue R-250* dalam 15% (v/v) metanol and 5% (v/v) asam asetat dan diurai dengan 30% (v/v) metanol dan 10% (v/v) asam asetat. Marker berat molekul digunakan untuk memperkirakan berat molekul protein. Marker yang digunakan meliputi myosin (200 kDa), α 2-*macroglobulin* (170 kDa), β -*galactosidase* (116 kDa), *transferrin* (76 kDa) dan *glutamate dehydrogenase* (53 kDa). Kolagen kulit ikan komersial digunakan sebagai standar. Analisis kuantitatif intensitas pita protein dilakukan menggunakan Model GS-700 *Imaging Densitometer* (Laboratorium *Bio-Rad, Hercules, CA, USA*) dengan *Molecular Analyst Software* versi 1.4 (sistem analisis gambar).

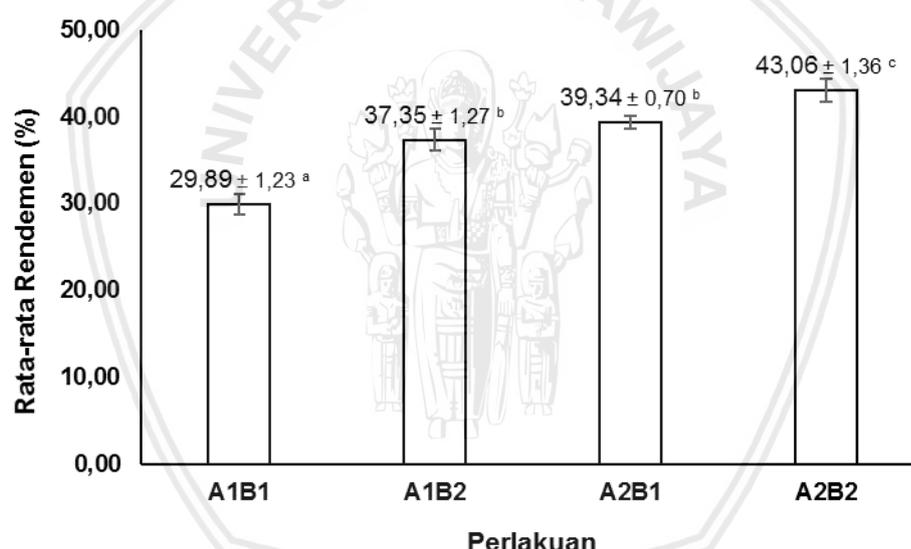
3.5.4 Komposisi Asam Amino (SIG, 2019)

Sampel kolagen cair 10 mL dihidrolisis dengan tekanan tereduksi dalam asam metana sulfonat 4 M yang mengandung 0,2% (v/v) 3-2 (2-aminoetil) pada suhu 115°C selama 24 jam. Hidrolisat dinetralkan dengan 3,5 M NaOH dan diencerkan dengan 0,2 M sitrat buffer (pH 2,2). Aliquot 0,4 mL diaplikasikan pada penganalisis asam amino (MLC-703; Atto Co., Tokyo, Jepang).

4. HASI DAN PEMBAHASAN

4.1 Rendemen Kolagen

Rendemen kolagen merupakan persentase kolagen yang dihasilkan dari berat bahan baku awal. Rendemen juga berguna untuk mengetahui keefektifan proses ekstraksi (Marzuki *et al.*, 2011) Hasil penelitian dengan beberapa perlakuan rasio kulit ikan dengan asam asetat dan lama waktu ekstraksi yang berbeda menunjukkan kolagen dari kulit ikan lele (*Lethrinus lentjan*) memiliki nilai rendemen yang berbeda. Rata-rata persentase rendemen kolagen dari kulit ikan lele dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Grafik rata-rata persentase rendemen kolagen. (Data Primer, 2019)

Keterangan:

A₁B₁ : Rasio kulit dengan asam asetat 1:10 (b/v) dan lama waktu ekstraksi 24 jam

A₁B₂ : Rasio kulit dengan asam asetat 1:10 (b/v) dan lama waktu ekstraksi 36 jam

A₂B₁ : Rasio kulit dengan asam asetat 1:20 (b/v) dan lama waktu ekstraksi 24 jam

A₂B₂ : Rasio kulit dengan asam asetat 1:10 (b/v) dan lama waktu ekstraksi 36 jam

Pada grafik rata-rata persentase rendemen, hasil analisis ANOVA menggunakan SPSS 25 dan uji lanjut *Tukey* dapat dilihat pada Lampiran 6 yang

menunjukkan bahwa rasio kulit dan lama waktu ekstraksi asam asetat yang berbeda menghasilkan perbedaan nyata terhadap rendemen kolagen kulit ikan lele ($p < 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa perbedaan rasio kulit dan asam asetat memberikan hasil yang berbeda, lama waktu ekstraksi menunjukkan memberikan hasil yang berbeda dan interaksi antara rasio kulit dengan asam asetat dan lama waktu ekstraksi memberikan hasil yang berbeda.

Ekstraksi kolagen dengan perbedaan rasio kulit ikan lele dengan asam asetat menunjukkan hasil rendemen yang berbeda, rasio 1:20 menunjukkan hasil yang lebih tinggi daripada rasio 1:10, hal ini sesuai dengan pernyataan Sadowska *et al.*, (2003), bahwa ekstraksi kolagen dengan tergantung pada rasio kulit dan asam asetat, persentase terbesar didapat pada rasio 1:40, dan menunjukkan perbedaan pada rasio 1:10 dengan 1:20, hasil konten kolagen dari kulit ikan *Baltic Cod (Gadus morhua)* didapat lebih besar pada rasio 1:20 daripada 1:10.

Semakin lama waktu ekstraksi menunjukkan hasil rendemen semakin tinggi, lama waktu ekstraksi 24 jam menghasilkan rendemen lebih rendah dari 36 jam, hal ini sesuai dengan pernyataan Wang *et al.*, (2008), hasil kolagen yang larut dalam asam asetat meningkat dengan perpanjangan waktu, peningkatan ditunjukkan ketika waktu lebih lama dari 24 jam dan hasil tertinggi ekstraksi kolagen dari kulit ikan *grass carp (Ctenopharyngodon idella)* yaitu 19,18 mg/g yang diamati setelah 36 jam perendaman dan setelah itu mengalami penurunan kolagen secara bertahap. Hasil isolasi kolagen dari kulit *Baltic Cod (Gadus morhua)* menurut Sadowska *et al.*, (2003), dengan lama waktu ekstraksi 72 jam menunjukkan tidak signifikan berbeda dengan 24 jam.

Pada perlakuan A_1B_1 menunjukkan notasi a, perlakuan A_1B_2 menunjukkan notasi b, perlakuan A_2B_1 menunjukkan notasi b dan perlakuan A_2B_2 menunjukkan notasi c. Namun, pada perlakuan A_1B_2 dan A_2B_1 menunjukkan notasi yang sama

hal ini menunjukkan bahwa rasio kulit dengan asam asetat 1:10 (b/v) selama 36 jam tidak ada perbedaan yang nyata dengan rasio kulit dengan asam asetat 1:20 (b/v) selama 24 jam. Dari hasil rendemen didapatkan rata-rata rendemen terendah kolagen dari kulit ikan lele pada perlakuan A₁B₁ yaitu menggunakan asam asetat 0,5 M rasio 1:10 (b/v) dengan lama waktu ekstraksi 24 jam senilai 29,89%. Sedangkan rata-rata rendemen tertinggi pada perlakuan A₂B₂ yaitu menggunakan asam asetat 0,5 M rasio 1:20 (b/v) dengan lama waktu ekstraksi 36 jam senilai 43,06%. Rata-rata tertinggi rendemen yang didapat lebih rendah dari yang dilaporkan Nagai dan Suzuki (2000), yang menyebutkan rendemen kolagen dari kulit ikan laut *chub mackerel* sebesar 49,80%, dan *Japanese sea-bass* sebesar 51,40%. Rata-rata terendah rendemen yang didapat lebih tinggi dari rendemen kulit ikan laut *Surf Smelt (Hypomesus pretiosus japonicus Brevoort)* yaitu sebesar 24,00% (Nagai *et al.*, 2010).

4.2 Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) Kolagen

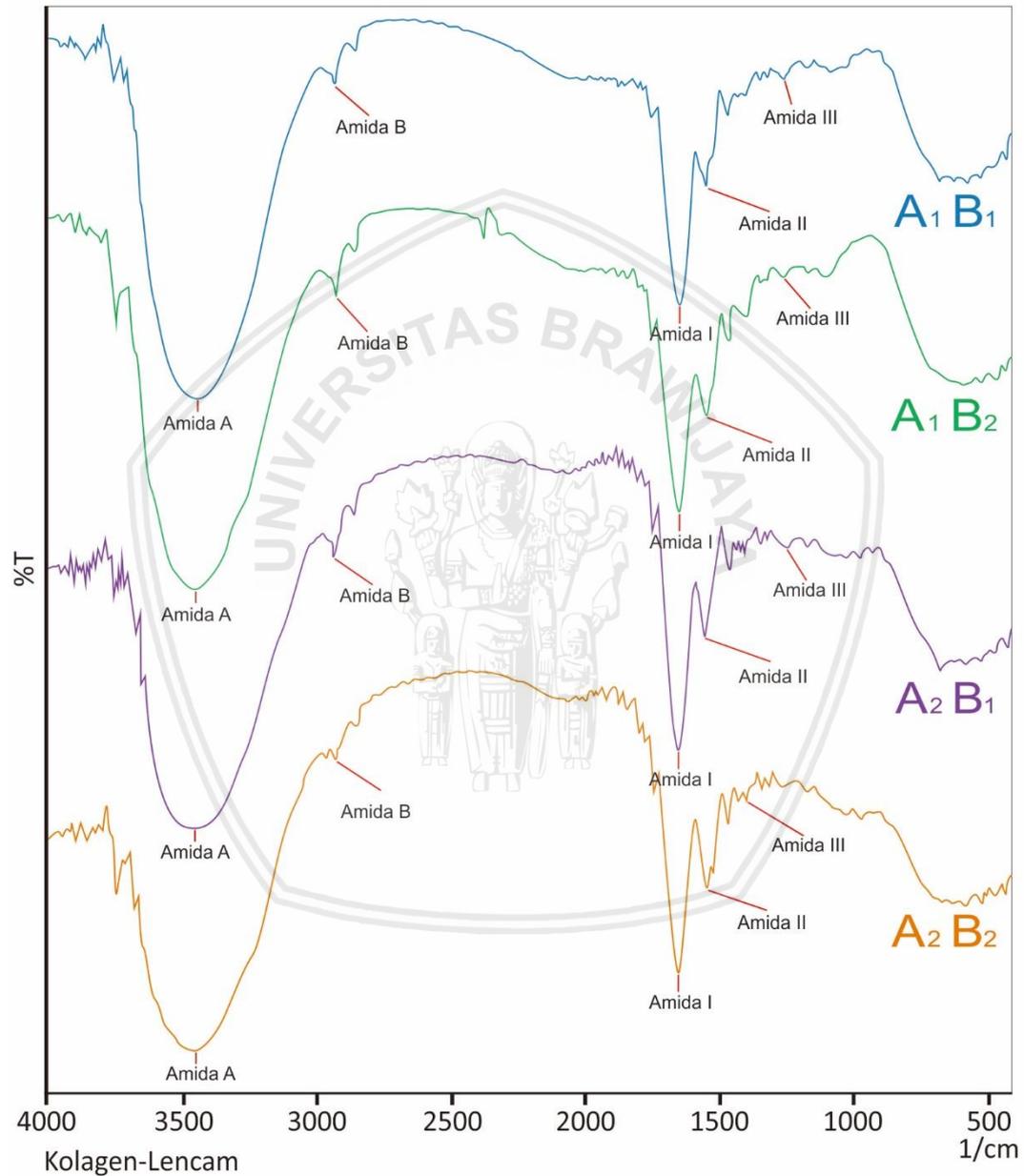
Analisis FTIR (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) yang dilakukan pada penelitian ini bertujuan untuk memastikan senyawa yang dihasilkan merupakan kolagen berdasarkan gugus-gugus fungsi penyusunnya. Hasil spektra *infrared* kolagen dari kulit ikan lele (*Lethrinus lentjan*) dan karakteristik gugus fungsi kolagen dari kulit ikan lele (*Lethrinus lentjan*) hasil analisis FTIR disajikan pada Tabel 5 dan Gambar 6 sebagai berikut.

Tabel 5. Karakteristik gugus fungsi kolagen dari kulit ikan lele.

Amida	Standar Serapan (cm ⁻¹)	Spektra kolagen kulit ikan lele (cm ⁻¹)				Karakteristik
		A ₁ B ₁ *	A ₁ B ₂ *	A ₂ B ₁ *	A ₂ B ₂ *	
Amida A	3400-3440 ⁽¹⁾	3436.49	3435.41	3438.56	3437.62	N-H <i>stretching</i> Asimetris <i>stretching</i> CH ₂ C-O <i>stretching</i> / ikatan H
Amida B	2915-2935 ⁽²⁾	2927.74	2925.81	2927.74	2929.67	
Amida I	1600-1700 ⁽³⁾	1649.02	1647.10	1652.88	1649.02	digabungkan dengan COO- C-N <i>stretching</i> dan N-H
Amida II	1480-1575 ⁽⁴⁾	1544.88	1544.88	1542.95	1544.88	

Amida III	1229–1301 ⁽³⁾	1245.93	1247.86	1242.07	1300.37	<i>bending</i> C-H stretching dan N-H <i>bending</i>
-----------	--------------------------	---------	---------	---------	---------	---------------------------------------------------------------

Sumber: ⁽¹⁾(Singh *et al.*, 2011); ⁽²⁾(Coates, 2000); ⁽³⁾(Kong dan Yu, 2007); ⁽⁴⁾(Kittiphattanabawon *et al.*, 2010); *(Data Primer, 2019).



Gambar 6. Spektra *infrared* kolagen kulit ikan lencam.

Berdasarkan hasil spektra *infrared* kolagen dari kulit ikan lencam menunjukkan bahwa puncak-puncak serapan pada wilayah amida meliputi amida A, amida B, amida I, II dan amida III yang merupakan serapan khas kolagen.

Amida A dikaitkan dengan frekuensi NH yang terjadi pada kisaran spektra 3400-3440 cm^{-1} (Singh *et al.*, 2011). Pada kolagen dari kulit ikan lencam (*Lethrinus lentjan*) A_1B_1 , A_1B_2 , A_2B_1 dan A_2B_2 didapat spektra berturut-turut sebesar 3436.49, 3435.41, 3438.56, 3437.62 cm^{-1} , menandakan bahwa semua perlakuan sudah termasuk dalam kisaran standar serapan yang berarti amida A terdeteksi pada bilangan gelombang masing-masing perlakuan.

Pada kelompok amida B berada di wilayah serapan pada kisaran spektra 2915-2935 cm^{-1} (Coates, 2000). Bilangan gelombang amida B terbentuk *Asimetrikal stretching* kelompok CH_2 (Zaelani *et al.*, 2019). Pada kolagen dari kulit ikan lencam (*Lethrinus lentjan*) A_1B_1 , A_1B_2 , A_2B_1 dan A_2B_2 didapat spektra berturut-turut sebesar 2927.74, 2925.81, 2927.74, 2929.67 cm^{-1} , menandakan bahwa semua perlakuan sudah termasuk dalam kisaran standar serapan yang berarti amida B terdeteksi pada bilangan gelombang masing-masing perlakuan.

Pada Ikatan amida I, amida II dan amida III umumnya dihasilkan dari masing-masing yaitu $\text{C} = \text{O}$, $\text{N} - \text{H}$, dan $\text{C} - \text{H}$ dari peptida, yang diketahui sebagai penentu atas tingkat tatanan molekul dengan struktur *triple helix* kolagen (Muyonga *et al.*, 2004). Pada Amida I terjadi pada serapan bilangan gelombang 1600-1700 cm^{-1} (Kong dan Yu, 2007). Amida I terkait dengan vibrasi *stretching* $\text{C} = \text{O}$ atau ikatan H- yang bergabung dengan COO^- (Chuaychan, 2016). Pada kolagen dari kulit ikan lencam (*Lethrinus lentjan*) A_1B_1 , A_1B_2 , A_2B_1 dan A_2B_2 didapat spektra berturut-turut sebesar 1649.02, 1647.10, 1652.88, 1649.02 cm^{-1} , menandakan bahwa semua perlakuan sudah termasuk dalam kisaran standar serapan yang berarti amida I terdeteksi pada bilangan gelombang masing-masing perlakuan.

Amida I menurut Muyonga *et al.*, (2004), terdiri dari empat struktur sekunder protein, yaitu α -heliks, β -sheet, β -turn, dan *random coil*. Setiap struktur sekunder protein memiliki wilayah serapan yang berbeda yaitu pada komponen

α -heliks ditunjukkan pada wilayah serapan bilangan gelombang 1656-1662 cm^{-1} ; β -sheet pada 1616 - 1637 cm^{-1} ; β -turn pada 1663-1696 cm^{-1} ; dan *random coil* pada 1638-1655 cm^{-1} (Fehng, 2016). Berdasarkan hasil bilangan gelombang amida I pada kolagen dari kulit ikan lele (*Lethrinus lentjan*) menunjukkan bahwa kolagen yang dihasilkan memiliki struktur *random coil*. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa molekul yang dihasilkan dari proses ekstraksi merupakan kolagen dan belum terdegradasi menjadi bentuk gelatin. Denaturasi kolagen akibat proses pemanasan, menyebabkan rantai *triple heliks* kolagen secara sempurna bertransformasi menjadi rantai tunggal α -heliks (gelatin) (Gomez-Guillén *et al.*, 2011).

Pada ikatan amida II menunjukkan keberadaan *stretching* C–N dan *bending* N–H di wilayah serapan spektra 1480-1575 cm^{-1} (Kittiphattanabawon *et al.*, 2010). Penyerapan yang lebih rendah menunjukkan bahwa kelompok NH terlibat dalam ikatan dengan rantai α , *triple helix* lengkap dari kolagen, dan ikatan hidrogen dalam kolagen (Zaelani *et al.* 2019). Pada kolagen dari kulit ikan lele (*Lethrinus lentjan*) A₁B₁, A₁B₂, A₂B₁ dan A₂B₂ didapat spektra berturut-turut sebesar 1544.88, 1544.88, 1542.95, 1544.88 cm^{-1} , menandakan bahwa semua perlakuan sudah termasuk dalam kisaran standar serapan yang berarti amida II terdeteksi pada bilangan gelombang masing-masing perlakuan.

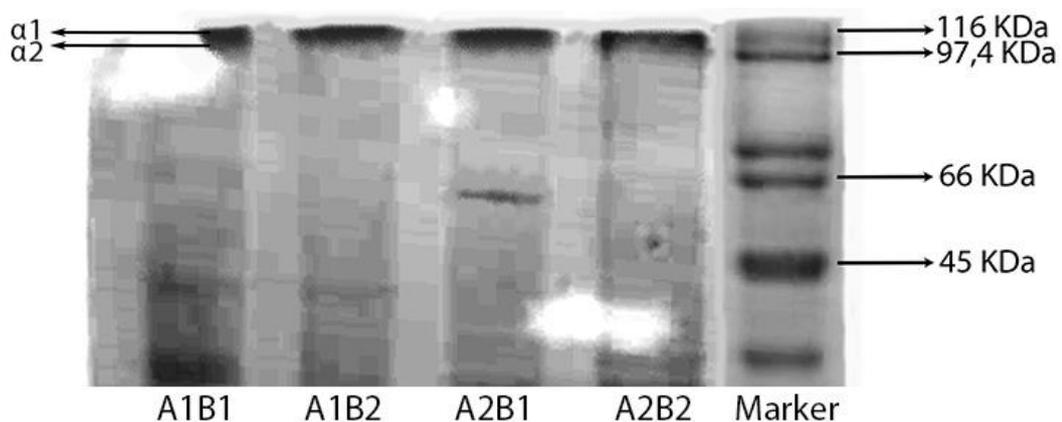
Pada ikatan amida III memiliki wilayah serapan spektra bilangan gelombang 1229–1301 cm^{-1} yang menunjukkan *stretching* C–N dan *bending* N–H (Kong dan Yu, 2007). Pada kolagen dari kulit ikan lele (*Lethrinus lentjan*) A₁B₁, A₁B₂, A₂B₁ dan A₂B₂ didapat spektra berturut-turut sebesar 1245.93, 1247.86, 1242.07, 1300.37 cm^{-1} . Puncak amida III memiliki hubungan interaksi intermolecular pada kolagen, ikatan-ikatan yang ada adalah CN *stretching* dan NH *bending* dari amida. Ini juga muncul dari vibrasi di luar bidang dari kelompok

CH₂ yang berasal dari ikatan utama glisin dan ikatan cabang proline (Chuaychan, 2016).

Berdasar hasil FTIR kolagen dari kulit ikan lele sesuai serapan khas kolagen pada umumnya. Hasil spektra *infrared* FTIR pada penelitian Zaelani *et al.*, (2019), kolagen dari kulit *Red Snapper (Lutjanus sp.)* menunjukkan adanya gugus amida A, amida B, amida I, amida II dan amida III yang terdeteksi pada gelombang serapan berturut-turut yaitu 3417.86 cm⁻¹; 2924.09 cm⁻¹; 1647.21 cm⁻¹; 1562.34 cm⁻¹; 1246.02 cm⁻¹ dan pada amida I menunjukkan komponen protein struktur *random coil*. Hal ini dikatakan bahwa struktur protein masih dipertahankan atau belum terdenaturasi menjadi gelatin oleh panas.

4.3 Berat Molekul (SDS-PAGE) Kolagen

Metode yang paling umum digunakan untuk memisahkan protein adalah dengan cara elektroforesis menggunakan *discontinuous poly acrylamide gel* sebagai medium penyangga dan *sodium dodecyl sulphate* (SDS) untuk mendenaturasi protein. Metode ini disebut *Sodium Dodecyl Sulphate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) merupakan analisis berat molekul dengan prinsip elektroforesis dengan pemisahan protein berdasarkan kemampuannya untuk bergerak terhadap muatan listrik (Singh *et al.*, 2011). Pita protein kolagen dari kulit ikan lele hasil SDS-PAGE dapat dilihat pada Gambar 7 sebagai berikut.



Gambar 7. Pita protein kolagen dari kulit ikan lencam.

Keterangan:

Marker: Protein standar

A₁B₁ : Rasio kulit dengan asam asetat 1:10 (b/v) dan lama waktu ekstraksi 24 jam

A₁B₂ : Rasio kulit dengan asam asetat 1:10 (b/v) dan lama waktu ekstraksi 36 jam

A₂B₁ : Rasio kulit dengan asam asetat 1:20 (b/v) dan lama waktu ekstraksi 24 jam

A₂B₂ : Rasio kulit dengan asam asetat 1:10 (b/v) dan lama waktu ekstraksi 36 jam

Berdasarkan hasil SDS-PAGE kolagen dari kulit ikan lencam (*Lethrinus lentjan*) didapatkan pita (*band*) protein yang bervariasi. Protein dengan berat molekul kecil akan bergerak lebih cepat melintasi gel dibandingkan protein dengan berat molekul besar sehingga protein dengan berat molekul rendah memiliki jarak tempuh (RF) lebih panjang dibandingkan protein dengan berat molekul tinggi (Djailani, *et al.* 2016). Kolagen kulit ikan lencam memiliki pola elektroforesis yaitu terdapat α_1 dan α_2 sebagai kandungan utama dengan berat molekul berkisar 100,32 – 113,34 kDa. Kehadiran dua rantai α identik dengan kolagen yang diekstraksi memiliki tipe I (Ogawa *et al.*, 2004).

Molekul kolagen tipe I terdiri dari dua rantai yang identik, berdasarkan kepadatan α_1 dua kali lipat dari α_2 disarankan bahwa kolagen kulit ikan lencam (*Lethrinus lentjan*) memiliki komposisi heterotrimer $(\alpha_1)_2 \alpha_2$, dengan kolagen tipe I (Fengh, 2016). Berat molekul penelitian kolagen dari kulit ikan lencam (*Lethrinus lentjan*) serupa dengan penelitian Sotelo *et al.*, (2016), yaitu berkisar 100 kDa. Tetapi sedikit lebih rendah daripada kolagen dari *sole fish skin* (*Aseraggodes umbratilis*) berkisar antara 116 – 118 kDa (Arumugam *et al.*, 2018). Perbedaan antara ukuran molekul tergantung pada metode ekstraksi, komposisi asam amino, spesies serta habitat sumber kolagen (Liu *et al.*, 2008).

Hasil pengamatan SDS-PAGE pada kolagen dari kulit ikan lencam menunjukkan bahwa tidak teramati secara jelas karena memiliki rantai yang

masih tampak berhimpitan. Kondisi ini dapat disebabkan karena komposisi asam amino yang tidak jauh berbeda atau bisa dikatakan bahwa berat molekulnya relatif sama (Fengh, 2016). Berat molekul lebih rendah dari 100 kDa menunjukkan bahwa selama ekstraksi asam beberapa lebih rentan terhadap hidrolisis sehingga menghasilkan berat molekul yang relatif rendah (Sotelo *et al.*, 2016).

4.4 Komposisi Asam Amino Kolagen

Analisis komposisi asam amino kolagen ditentukan oleh hidrolisis asam dari kolagen kulit ikan. Komposisi asam amino untuk kolagen dari kulit ikan lencam (*Lethrinus lenjtan*) dinyatakan sebagai persentase hasil asam amino dari total asam amino yang diujikan, dan ditunjukkan pada Tabel 6 sebagai berikut.

Tabel 6. Komposisi Asam Amino.

Asam Amino	Kolagen (%)				
	^a Ikan Lencam	^b Bigeye snapper	^c Ikan Mas	^d Komersial (sapi)	
Essensial	Fenilalanin	3,70	1,51	1,30	1,39
	Isoleusin	1,09	0,50	1,00	0,81
	Valin	2,29	2,22	1,90	1,54
	Arginin	11,02	6,05	5,50	3,94
	Lisin	2,81	3,13	2,80	2,66
	Leusin	2,72	2,42	2,20	2,10
	Prolin	12,01	11,69	11,40	10,79
	Threonin	3,75	2,92	2,40	1,58
	Histidin	1,58	1,01	0,50	0,37
Nonesensial	Glisin	28,19	28,83	33,20	35,59
	Alanin	10,25	13,71	11,80	12,25
	Asam Aspartat	5,14	5,14	4,90	4,40
	Asam Glutamat	9,15	7,86	7,60	7,13
	Serin	4,91	3,63	3,50	3,84
	Tirosin	1,38	0,40	0,30	0,18

Sumber: ^a(SIG, 2019); ^b(Kittiphattanabawon *et al.*, 2005); ^c(Duan *et al.*, 2009); ^d(Carvalho *et al.*, 2018).

Nilai asam amino yang didapat pada kolagen dari kulit ikan lencam sedikit lebih rendah dari kolagen komersial yang berasal dari sapi dan kolagen dari ikan

air tawar yaitu ikan mas. Hal ini menunjukkan bahwa kolagen dari ikan air laut maupun air tawar memiliki nilai asam amino yang lebih rendah dari kolagen komersial yang berasal dari mamalia yaitu sapi. Penelitian yang dilaporkan Carvalho *et al.*, (2018), kolagen komersial dari sapi menunjukkan bahwa nilai glisin 35,59% paling tinggi daripada kolagen dari ikan laut maupun tawar prolin senilai 10,79% lebih rendah dibandingkan kolagen dari ikan dan alanin senilai 12,25% lebih tinggi dari kolagen ikan mas maupun ikan lencam.

Berdasarkan Tabel 7 di atas, komposisi asam amino kolagen dari kulit ikan lencam (*Lethrinus lentjan*) menunjukkan bahwa glisin, prolin, arginin dan alanin merupakan asam amino tertinggi dibandingkan asam amino yang lain. Hal ini seperti asam amino kolagen pada umumnya yang disusun atas asam amino yang dominan berupa Gly-x-y yaitu komposisi utama glisin dan x dapat berupa prolin dan y dapat berupa hidroksiprolin, alanin, arginin yang disusun berulang (Carvalho *et al.*, 2018). Kandungan asam amino dalam kolagen adalah glisin, dengan tingkat tirosin dan histidin yang rendah dan tidak mengandung triptofan dan sistein (Fenhg, 2016). Hasil penelitian kolagen dari kulit ikan lencam (*Lethrinus lentjan*) menunjukkan nilai glisin sebesar 28,19%, prolin sebesar 12,01%, arginin sebesar 11,02 %, alanin sebesar 10,25%, dan asam glutamat sebesar 9,15%. Nilai asam amino ini mendekati dengan nilai asam amino pada penelitian kolagen kulit *bigeye snapper* (*Priacanthus tayenus*) oleh Kittiphattanabawon *et al.*, (2005), dengan nilai asam amino glisin sebesar 28,23%, prolin sebesar 11,9%, dan alanin sebesar 13,71%.

Glisin konten dari kolagen kulit ikan sekitar 30% dari total asam amino. Umumnya glisin mewakili hampir satu kali dari total residu kolagen kecuali 14 asam amino pertama dari terminal-N dan 10 atau lebih pertama dari terminal-C (Burghagen, 1999). Kolagen dari kulit ikan memiliki derajat hidroksilasi prolin 24,4%. Oksidasi prolin menjadi residu terhidroksilasi dikatalisis oleh prolin

hidroksilase (Burghagen, 1999). Dari hasilnya, hidroksilasi prolin dari kolagen kulit ikan lele (*Lethrinus lentjan*) sedikit lebih besar dari kolagen kulit *bigeye snapper* (*Priacanthus tayenus*). Prolin terhidroksilasi memiliki peran dalam menstabilkan *triple helix*, sehingga membuat ikatan yang kompleks dan tidak mudah terhidrolisis (Ramachandran, 1988). Dapat dikatakan bahwa kolagen dari kulit ikan lele (*Lethrinus lentjan*) memiliki sedikit struktur yang lebih kompleks daripada kolagen dari kulit *bigeye snapper* (*Priacanthus tayenus*) seperti yang ditunjukkan oleh tingkat hidroksilasi yang lebih tinggi.

Komposisi kandungan asam amino antara spesies hewan dapat dihubungkan dengan perbedaan suhu hidup spesies tersebut. Selain itu, kandungan asam amino juga sebanding dengan suhu denaturasi kolagen. Dapat dikatakan bahwa semakin tinggi suhu hidup spesies kolagen maka akan semakin tinggi pula suhu denaturasi kolagen (Muralidharan *et al.*, 2013). Kestabilan *triple-helix* pada kolagen dipengaruhi oleh kandungan asam amino, semakin tinggi kandungan asam amino maka *triple-helix* kolagen akan semakin stabil, karena struktur molekul kolagen dipertahankan terutama pada perubahan struktur sekunder rantai polipeptida, dan juga dipertahankan sebagian oleh kemampuan ikatan hidrogen melalui kelompok hidroksiprolin (Li *et al.*, 2013).

5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Perbedaan rasio kulit ikan lele (*Lethrinus lentjan*) dengan asam asetat dan lama waktu ekstraksi berpengaruh terhadap rendemen. Rendemen tertinggi ditunjukkan oleh perlakuan A₂B₂ yaitu rasio kulit ikan lele dengan asam asetat 1:20 (b/v) dan lama waktu ekstraksi 36 jam sebesar 43,06% dengan karakteristik wilayah amida meliputi amida A (3435.41-3438.56 cm⁻¹), amida B (2929.67-2925.81 cm⁻¹), amida I (1647.10-1649.02 cm⁻¹), II (1542.95-1544.88 cm⁻¹) dan amida III (1242.07-1300.37 cm⁻¹) dan pada amida I menunjukkan kolagen memiliki struktur *random coil*. Kolagen termasuk tipe I yang terdiri dari rantai α1 dan α2 dengan berat molekul berkisar 100,32 – 113,34 kDa. Asam amino tertinggi meliputi nilai glisin sebesar 28,19%, prolin sebesar 12,01%, arginin sebesar 11,02 % dan alanin sebesar 10,25% yang identik dengan kolagen pada umumnya.

5.2 Saran

Perlu adanya kajian lebih mendalam terkait metode pengujian SDS-PAGE / berat molekul agar didapatkan hasil dengan gambar yang lebih jelas sehingga dapat diinterpretasikan sesuai dengan konteks penelitian dan saat pengujian SDS-PAGE agar tidak hanya menggunakan satu standar marker namun dengan standar marker yang lain dengan berat molekul lebih dari 116 kDa.

DAFTAR PUSTAKA

- [FAO] Food and Agriculture Organization. 2001. *FAO Species identification guide for fishery purposes, the lining marine resources of the western central pacific*, Volume 5. Synop. 3004-3006.
- Arumugam, G. K. S., D. Sharma., R. M. Balakrishnan dan J. B. P. Ettiyappan. 2018. Extraction, optimization and characterization of collagen from sole fish skin. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*. **9** (2018): 19–26.
- Bareil, R. P., R. Gauvin dan F. Berthod. 2010. Collagen based biomaterials for tissue engineering applications. *Materials*. **3**: 1863-1887.
- Burghagen, M. 1999. Meat. In h. D. Belitz & w. Grosch (eds.), *Food chemistry*. **2**: 527–580. Berlin, Germany: Springer-Verlag.
- Carvalho, A. M., A. P. Marques., T. H. Silva dan R. L. Reis. 2018. Evaluation of the potential of collagen from codfish skin as a biomaterial for biomedical applications. *Marine Drugs*. **16** (495): 1-14.
- Chuaychan, S. 2016. Production characterization of collagen, gelatin and gelatin hydrolysate powder from scales of spotted golden goatfish. *Thesis*. Submitted in Partial Fulfillment of The Requirements for Degree of Master of Science in Food Science and Technology Prince of Songkla University.
- Coates, J. 2000. *Interpretation of infrared spectra, a practical approach*. Encyclopedia of Analytical Chemistry. USA.
- Djailani, F., W. Trilaksani dan T. Nurhayati. 2016. Optimasi ekstraksi dan karakterisasi kolagen dari gelembung renang ikan cunang dengan metode asam-hidro-ekstraksi. *JPHPI*. **19** (2): 156-167.
- Duan, R., J. Zhang., X. Du., X. Yao dan K. Konno. 2009. Properties of collagen from skin, scale and bone of carp (*Cyprinus carpio*). *Food Chemistry*. **112** (2009): 702-706.
- Fehng, S. P, C. 2016. Extraction of collagen from fish wastes, optimization and characterization. *Thesis*. Department of Chemical Engineering. Lee Kong Chian Faculty of Engineering and Science, Universiti Tunku Abdul Rahman. Malaysia.
- Frick, H. 2008. *Pedoman Karya Ilmiah*. Kanisius: Yogyakarta.
- Giraud-Guille, M., L. Besseau., C. Chopin., P. Durand dan D. Herbage. 2000. Structural aspects of fish skin collagen which forms ordered arrays via liquid crystalline states. *Biomaterials*. **21** (2000): 899-906.
- Gómez-Guillén, M. C., B. Giménez., M.E. López-Caballero dan M. P. Montero. 2011. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from

alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids*. **25** (2011): 1813-1827.

Innova Market Insights. 2017. *Trends in Collagen*. www.innovadatabase.com.

Jongjareonrak. A., S. Benjakul., W. Visessanguan., T. Nagai dan M. Tanaka. 2005. Isolation and characterization of acid and pepsin-solubilised collagens from the skin of Brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*). *Food Chemistry* **93** (2005): 475–484.

Kim, S. K. Dan E. Mendis. 2006. Bioactive compounds from marine processing by products- A review. *Food Research International*. **39**: 383-393.

Kittiphattanabawon, P., S. Benjakul., W. Visessanguan., T. Nagai dan M. Tanaka. 2005. Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). *Food Chemistry*. **89** (2005): 363–372.

_____, S. Benjakul., W. Visessanguan dan F. Shahidi. 2010. Isolation and properties of acid- and pepsin-soluble collagen from the skin of blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*). *Eur Food Res Technol*. **230** (2010): 475–483.

Koentjaraningrat. 1993. *Metode-Metode Penelitian Masyarakat*. PT. Gramedia: Jakarta.

Kong, J dan S. Yu. 2007. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochem Biophys Sin*. **39** (8): 549-559.

Kumar MH, Spandana V, and Poonam T. 2011. Extraction and determination of collagen peptide and its clinical importance from tilapia fish scales (*Oreochromis niloticus*). *International Research Journal of Pharmacy*. **2**(10):97-99.

Lee, C. H., A. Singla dan Y. Lee. 2001. Biomedical applications of collagen. *International Journal of Pharmaceutics*. **221**:1-22.

Li, Z. R., B. Wang., C. F. Chi., Q. H. Zhang., Y. Gong., J. Tang. H. Y. Luo dan G. F. Ding. 2018. Isolation and characterization of acid soluble collagens and pepsin soluble collagens from the skin and bone of Spanish mackerel (*Scomberomorous niphonius*). *Food Hydrocolloids*. **31** (2013): 103-113.

Liu, D., G. Wei., T. Li., J. Hu., N. Lu., J. M. Regenstein dan P. Zhou. 2015. Effects of alkaline pretreatments and acid extraction conditions on the acidsoluble collagen from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin. *Food Chemistry*. 2014.

Liu, H., D. Li., dan S. Guo. 2008. Rheological properties of Channel catfish (*Ictalurus punctatus*) gelatin from fish skins preserved by different methods. *LWT-Food Science and Technology*, **41**: 414-419.

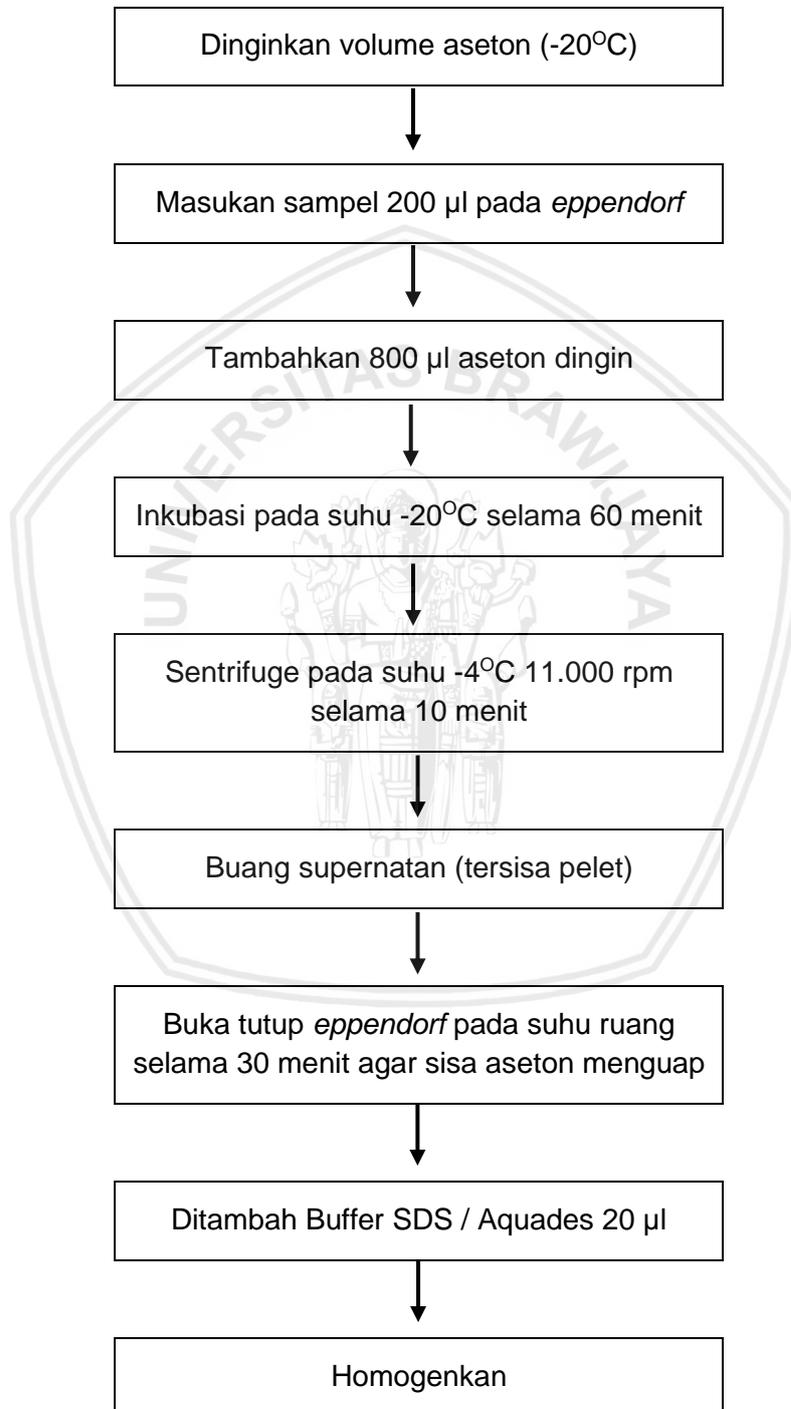
- Liu, W. G. Li., Y. Miao dan X. Wu. 2009. Preparation and characterization of pepsin-solubilized type i collagen from the scales of snakehead (*Ophiocephalus argus*). *Journal of Food Biochemistry*. **33** (2009): 20–37.
- Madhuri., V. Bhuimbar., Prashant., K. Bhagwat., Padma dan B. Dandge. 2019. Title: Extraction and characterization of acid soluble collagen from fish waste: Development of collagen-chitosan blend as food packaging film. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. **19** (102983): 1-22.
- Marsoali, M. K. 2001. Model pemanfaatan sumberdaya perikanan karang berkelanjutan di kawasan pulau-pulau kecil studi kasus perikanan lencam (*Lethrinus lentjan*) sistem tradisional di kawasan terumbu karang Kepulauan Guraici, Kabupaten Maluku Utara. Program Pasca Sarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Marzuki A., E. Pakki dan F. Zulfikar. 2011. Ekstraksi dan penggunaan gelatin dari limbah tulang ikan bandeng (*chanos chanos forskal*) sebagai emulgator dalam formulasi sediaan emulsi. *Majalah Farmasi dan Farmakolog*. **15** (2): 63-68.
- Muralidharan, N., R. J. Shakila., D. Sukumar dan G. Jeyasekaran. 2011. Skin, bone and muscle collagen extraction from the trash fish, leather jacket (*Odonus niger*) and their characterization. *Journal of Food Scientists & Technologists*. 2011.
- Muyonga, J. H., C. G. B. Cole dan K. G. 2004. Characterisation of acids soluble collagen from skins of young and adult Nileperch (*Lates niloticus*). *Food Chemistry*. **85** (1): 81-89.
- Nagai, T. dan N. Suzuki. 2000. Isolation of collagen from fish waste material - skin, bone and fins. *Food Chemistry*. **68** (2000): 277-281.
- Nazir, M. 2005. *Metode Penelitian*. Ghalia Indonesia: Bogor.
- Ogawa, M., R. P. Portier., M. W. Moody., J. Bell., M.A. Schexnayder dan J. N. Lasso. 2004. Biochemical properties of bone and scale collagens isolated from the subtropical fish black drum (*Pogonia cromis*) and sheepshead seabream (*Archosargus probatocephalus*). *Food Chemistry*. **88** (2004): 495–501.
- Sadowska, M., I. Kolodziejska dan C. Niecikowska. 2003. Isolation of collagen from the skins of Baltic cod (*Gadus morhua*). *Food Chemistry*. **81** (2003): 257–262.
- Schimdt, M., M. R. C. P. Dornelles., R. O. Mello., E. H. Kubota., M. A. Mazutti., A. P. Kempa dan I. M. Demiate. 2016. Collagen extraction process. *International Food Research Journal*. **23** (3): 913-922.
- Secchi, G. 2008. Role of protein in cosmetics. *Clinics in Dermatology*. **26**: 321-325.
- Sevtian. A. 2012. Distribusi dan aspek pertumbuhan ikan lencam (*Lethrinus lentjan*) di perairan dangkal karang cangkak, taman nasional laut

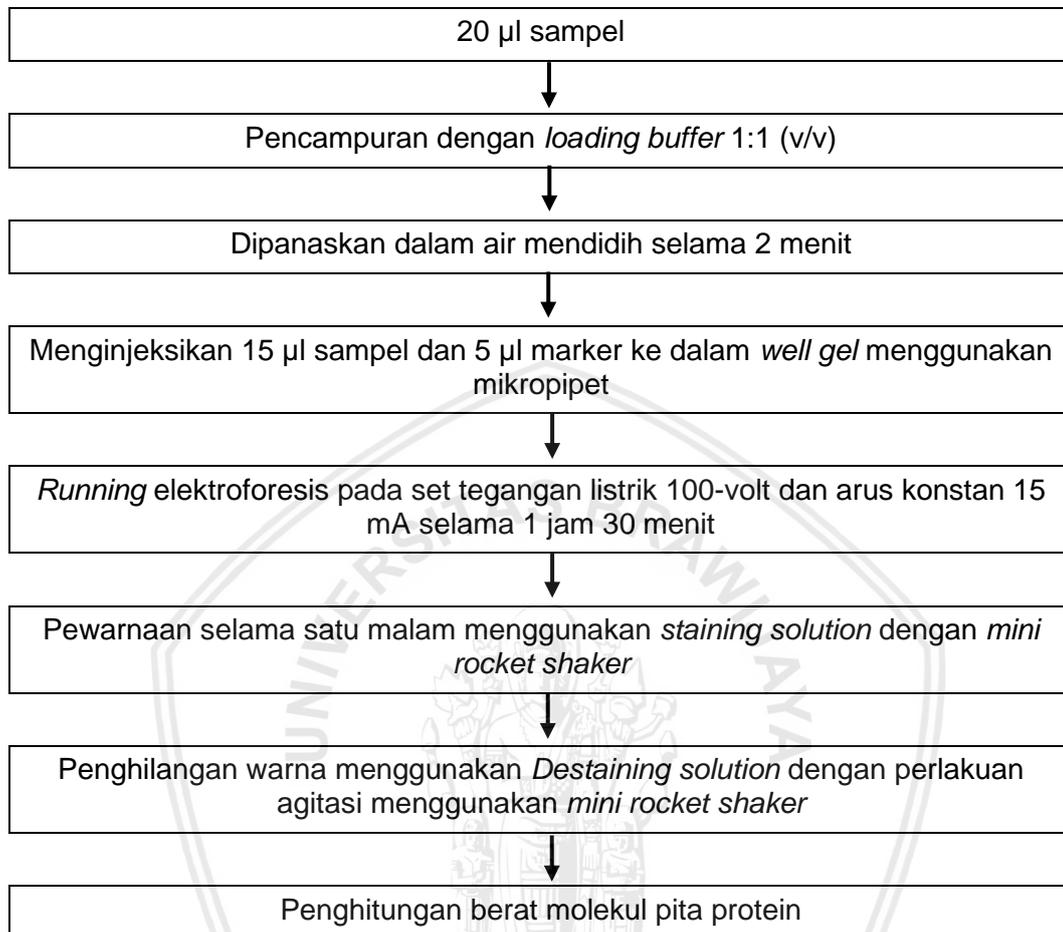
kepulauan seribu, jakarta. Departemen Manajemen Sumberdaya Perairan. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor. Bogor.

- Silva, M. R., L. R. Celem., S. R. Silva dan A. P. F. Costa. 2013. Anti aging cosmetics: Facts and controversies. *Clinics in Dermatology*. **31**: 750-758.
- Singh, P., S. Benjakul., S. Maqsood dan H. Kishimura. 2011. Isolation and characterisation of collagen extracted from the skin of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Food Chemistry*. **124** (2011): 97–105.
- Skierka, E. and M. Sadowska. 2007. The influence of different acids and pepsin on the extractability of collagen from the skin of Baltic cod (*Gadus morhua*). *Food Chemistry*. **105** (3): 1302-1306.
- Sorushanova, A., M. L. Delgado., Z. Wu., N. Shologu., A. Kshirsagar., R. Raghunath., A. M. Mullen., Y. Bayon., A. Pandit., M. Raghunath dan D. I. Zeugolis. 2019. The collagen suprafamily: from biosynthesis to advanced biomaterial development. *Advanced Materials*. **31** (180): 1-39.
- Sotelo, C. G., M. B. Comesana., P. R. Ariza dan R. P. Martin. 2016. Characterization of collagen from different discarded fish species of the west coast of the iberian peninsula. *Journal of aquatic food product technology*. **25** (3): 388–399.
- Thermo Scientific. 2009. *Acetone precipitation of Proteins*. www.thermo.com/pierce.
- Trevitt, C. R. dan P. N. Singh. 2003. Variant Creutzfeldt-Jakob disease: pathology, epidemiology, and public health implications. *Journal Clinical Nutrition*. **78** (2003): 651S–6S.
- Wang, L., B. Yang., X. Du., Y. Yang dan J. Liu. 2008. Optimization of conditions for extraction of acid-soluble collagen from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) by response surface methodology. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. **9** (2008): 604–607.
- Zaelani, B. F. D., M Safithri., K. Tarman., I. Setyaningsih dan Meydia. Collagen isolation with acid soluble method from the skin of red snapper (*Lutjanus* sp.). *Earth and Environmental Science*. **241** (2019): 1-9.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Diagram alir preparasi sampel SDS-PAGE.



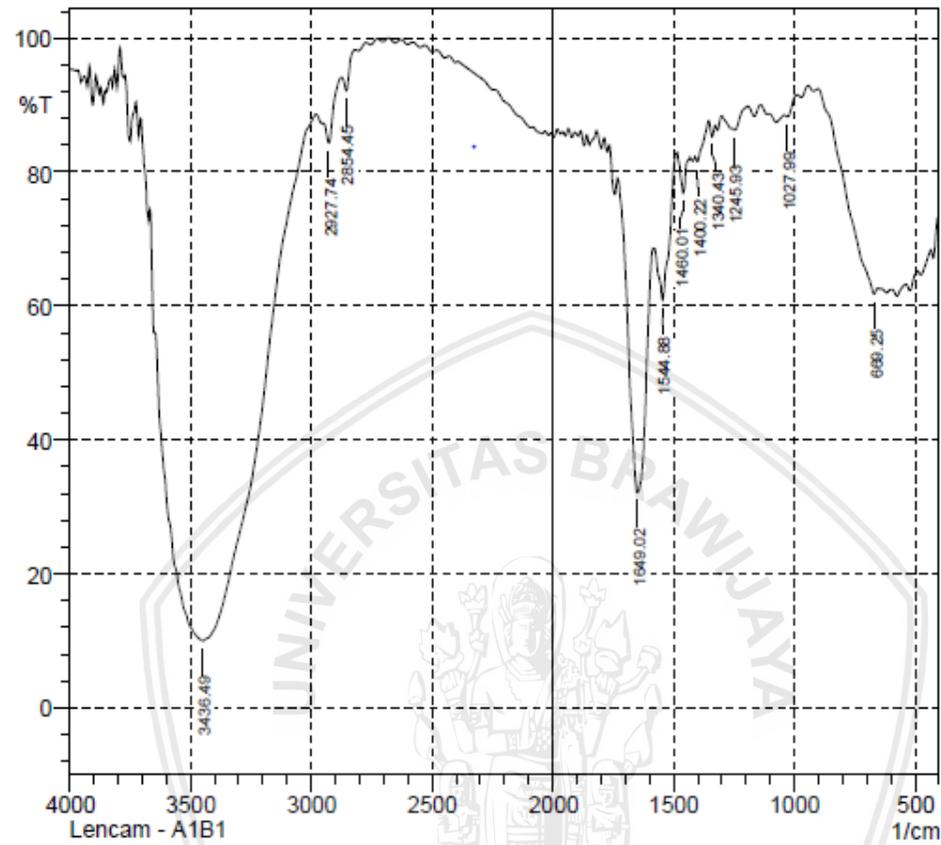
Lampiran 2. Diagram alir pengujian SDS-PAGE.

Lampiran 3. Data rendemen.

Perlakuan			Ulangan			Rata-rata	Stdev
Rasio	Lama Waktu	Label	1	2	3		
1:10	24	A ₁ B ₁	28,60	30,00	31,06	29,89	1,23
	36	A ₁ B ₂	36,10	38,64	37,32	37,35	1,27
1:20	24	A ₂ B ₁	38,60	39,43	40,00	39,34	0,70
	36	A ₂ B ₂	41,70	43,08	44,41	43,06	1,36



Lampiran 4. Data hasil pengujian FTIR.

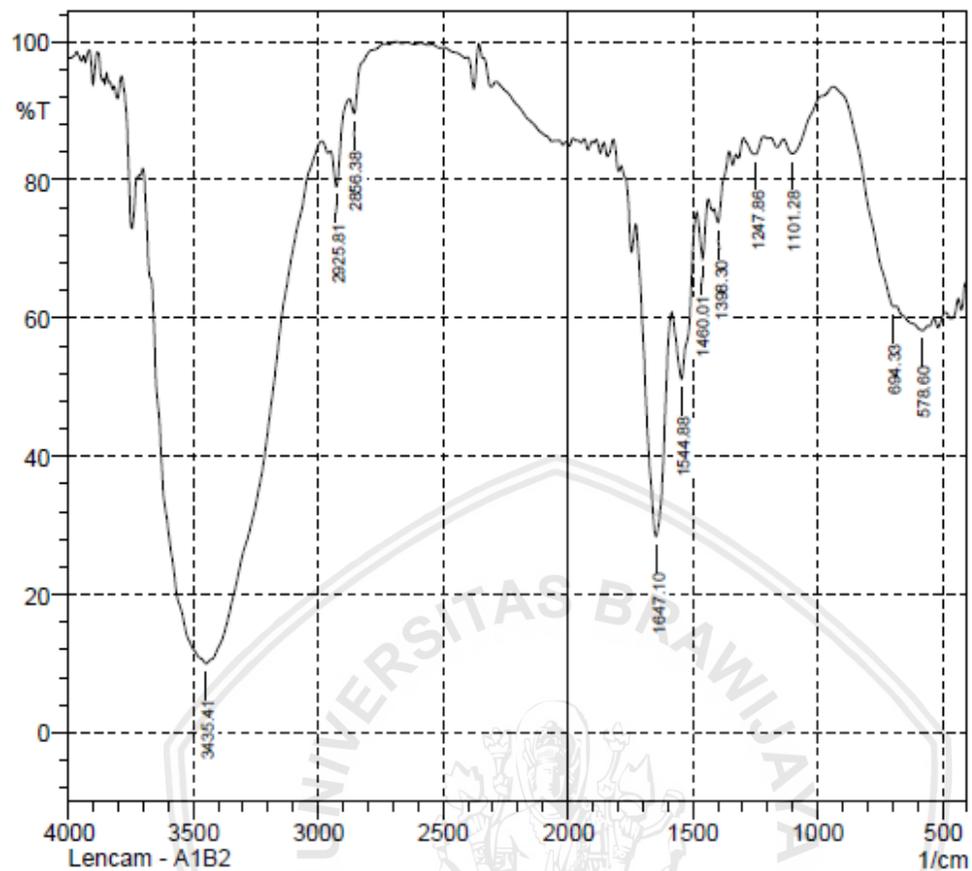


Comment;
Lencam - A1B1

Date/Time; 4/29/2019 8:54:52 AM
No. of Scans; 10
Resolution; 4.0
User; Kimia FMIPA-UB

Peak	Intensity	Corr. Inte	Base (H)	Base (L)	Area	Corr. Are	
1	669.25	61.813	2.444	900.7	655.75	29.931	1.48
2	1027.99	88.25	1.008	1041.49	987.49	2.574	0.101
3	1245.93	86.254	1.002	1261.36	1191.93	3.875	0.071
4	1340.43	85.238	2.057	1353.94	1326.93	1.729	0.135
5	1400.22	81.539	1.792	1411.8	1353.94	4.374	0.263
6	1460.01	76.861	5.449	1483.16	1438.8	4.364	0.619
7	1544.88	60.869	13.301	1579.59	1490.87	14.738	3.848
8	1649.02	32.178	40.942	1731.96	1685.38	43.784	24.233
9	2854.45	92.108	3.429	2873.74	2817.81	1.219	0.266
10	2927.74	84.304	5.02	2950.89	2873.74	3.886	0.589
11	3436.49	10	55.669	3645.21	2981.74	341.257	240.499



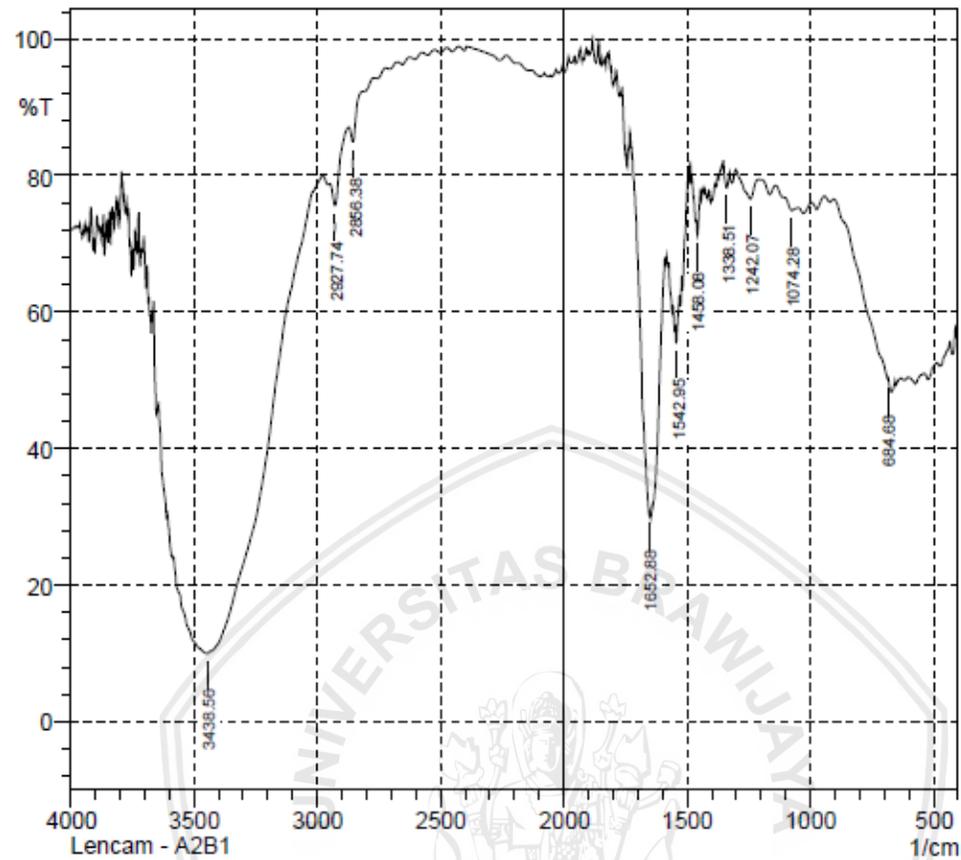


Comment;
Lencam - A1B2

Date/Time; 4/29/2019 9:50:03 AM
No. of Scans; 10
Resolution; 4.0
User; Kimia FMIPA-UB

	Peak	Intensity	Corr. Inte	Base (H)	Base (L)	Area	Corr. Are
1	578.6	58.197	1.129	684.68	559.32	28.328	0.774
2	694.33	61.658	1.077	935.41	686.61	27.047	0.427
3	1101.28	83.805	3.428	1135.99	937.34	10.623	1.181
4	1247.86	83.722	2.49	1296.08	1215.07	5.796	0.567
5	1398.3	73.846	4.082	1413.72	1353.94	6.392	0.547
6	1460.01	68.604	7.717	1483.16	1438.8	6.206	0.989
7	1544.88	51.177	15.323	1583.45	1485.09	22.457	5.866
8	1647.1	28.382	37.945	1726.17	1585.38	49.777	25.035
9	2856.38	89.649	3.148	2875.67	2734.87	2.213	-0.526
10	2925.81	79.042	7.643	2950.89	2875.67	5.177	0.948
11	3435.41	10	73.031	3701.14	2987.53	358.162	302.625

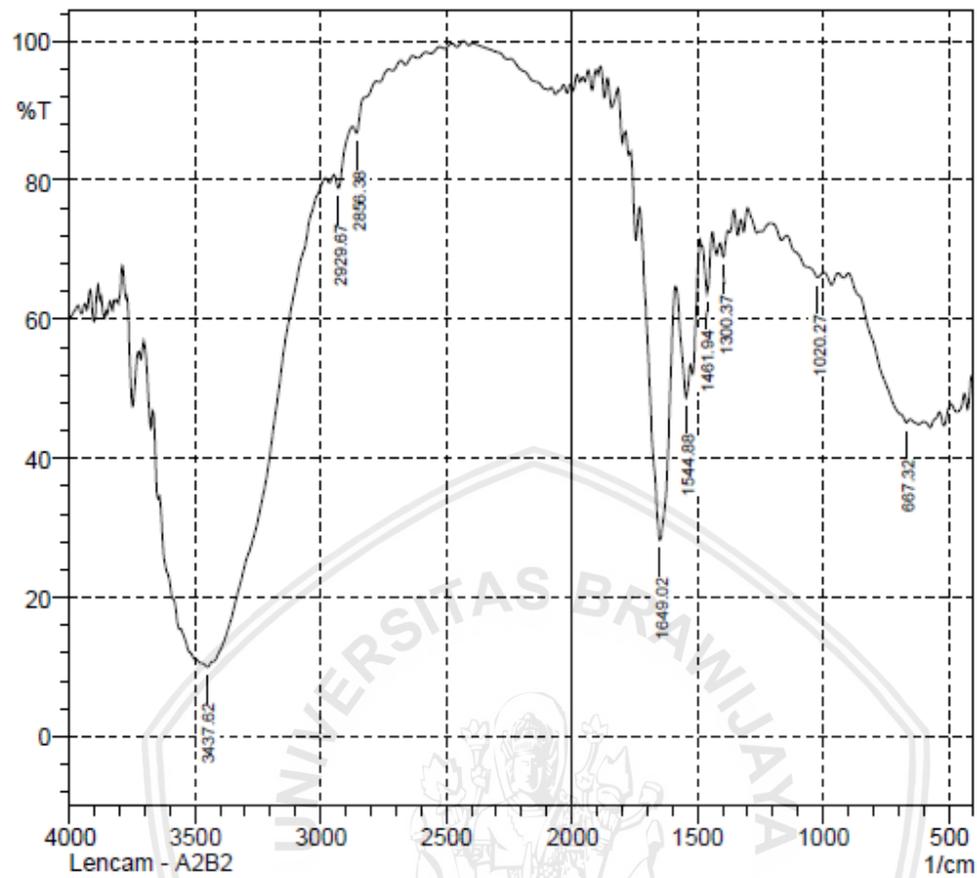




Comment;
Lencam - A2B1

Date/Time; 4/29/2019 8:59:17 AM
No. of Scans; 10
Resolution; 4.0
User; Kimia FMIPA-UB

	Peak	Intensity	Corr. Inte	Base (H)	Base (L)	Area	Corr. Are
1	684.88	50.128	0.426	902.62	682.75	43.759	-1.803
2	1074.28	74.858	1.112	1107.08	1047.27	7.278	0.166
3	1242.07	76.568	3.362	1301.86	1211.21	9.593	0.889
4	1338.51	78.197	3.016	1352.01	1326.93	2.511	0.253
5	1458.08	71.275	3.611	1483.87	1444.58	2.52	0.196
6	1542.95	55.52	3.293	1546.8	1529.45	4.034	0.184
7	1652.88	30.343	1.816	1722.31	1650.95	20.138	-0.971
8	2856.38	84.938	3.227	2871.81	2771.52	4.293	-0.006
9	2927.74	75.595	5.437	2948.96	2871.81	6.951	0.625
10	3438.56	10	1.448	3581.56	3434.98	128.555	10.864



Comment;
Lencam - A2B2

Date/Time; 4/29/2019 9:23:53 AM
No. of Scans; 10
Resolution; 4.0
User; Kimia FMIPA-UB

	Peak	Intensity	Corr. Inte	Base (H)	Base (L)	Area	Corr. Are
1	667.32	45.171	1.787	898.77	651.89	66	2.188
2	1020.27	66.033	1.537	1143.71	997.13	24.341	1.005
3	1300.37	69.001	2.619	1407.94	1377.08	4.663	0.231
4	1461.94	63.754	7.658	1479.3	1440.73	6.588	0.97
5	1544.88	48.738	7.995	1587.31	1527.52	15.443	1.666
6	1649.02	28.219	41.398	1730.03	1587.31	48.968	26.929
7	2856.38	86.799	2.008	2871.81	2777.3	3.886	-0.015
8	2929.67	78.827	3.552	2947.03	2871.81	6.015	0.391
9	3437.62	10	0.681	3473.56	3429.2	43.682	0.581



Lampiran 5. Data hasil pengujian asam amino.



PT. SARASWANTI INDO GENETECH

The First Indonesian Molecular Biotechnology Company

GRAHA SIG Jl. Hasamala No. 20 Taman Yasmin Bogor 16113 INDONESIA
Phone: +62-251-7532348 (bunting) 082 111 516 516 Fax: +62-251-7540-922 http://www.siglaboratory.com



No : SIG CL V.2019.013713
Lamp. : 1 halaman
Perihal : **Laporan Hasil Uji Laboratorium**

Bogor, 29 Mei 2019

Kepada Yth.

Universitas Brawijaya
Jl. MT Haryono xi D no. 460 Dinoyo Malang

Dengan hormat,

Berdasarkan surat order marketing nomor : SIG.Mark.P.V.2019.000378 , maka bersama ini kami sampaikan hasil uji analisis laboratorium untuk sample produk :

Nama Sample : Kolagen Cair (Lencam)
Keterangan : Terlampir

Demikian surat ini kami sampaikan semoga dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Atas kerjasama yang baik kami mengucapkan terima kasih.

Hormat kami,
PT Saraswanti Indo Genetech

Robertus B. Aryo
Manager Marketing





PT. SARASWANTI INDO GENETECH
The First Indonesian Molecular Biotechnology Company

GRAHA SIG Jl. Rasamala No. 20 Taman Yasmin Bogor 16113, INDONESIA
Phone: +62 251 7532348 (hunting) 082 111 516 516 Fax: +62 251 7540 927, http://www.siglaboratory.com

No. 28 1/F-PP/SMM-SIG
Revisi 3

Result of Analysis
No: SIG.LHP.V.2019.042432

No.	Parameter	Unit	Result	Limit of Detection	Method
1	L-Serin	mg / kg	720.90	-	18-5-17/MU/SMM-SIG, UPLC
2	L-Asam glutamat	mg / kg	1344.25	-	18-5-17/MU/SMM-SIG, UPLC
3	L-Fenilalanin	mg / kg	542.74	-	18-5-17/MU/SMM-SIG, UPLC
4	L-Isoleusin	mg / kg	160.24	-	18-5-17/MU/SMM-SIG, UPLC
5	L-Valin	mg / kg	336.48	-	18-5-17/MU/SMM-SIG, UPLC
6	L-Alanin	mg / kg	1505.44	-	18-5-17/MU/SMM-SIG, UPLC
7	L-Arginin	mg / kg	1618.43	-	18-5-17/MU/SMM-SIG, UPLC
8	Glisin	mg / kg	4139.54	-	18-5-17/MU/SMM-SIG, UPLC
9	L-Lisin	mg / kg	412.10	-	18-5-17/MU/SMM-SIG, UPLC



PT. SARASWANTI INDO GENETECH

The First Indonesian Molecular Biotechnology Company

GRAHA SIG Jl. Basamala No. 20 Taman Yasmin Bogor 16113, INDONESIA.
Phone: +62-251-7532348 (hunting) 082 111 516 516. Fax: +62-251-7540 927. <http://www.siglaboratory.com>

No. 28.1/F-PP/SMM-SIG
Revisi 3

Result of Analysis

No: SIG.LHP.V.2019.042432

No.	Parameter	Unit	Result	Limit of Detection	Method
10	L-Asam Aspartat	mg / kg	754.82	-	18-5-17/MU/SMM-SIG, UPLC
11	L-Leusin	mg / kg	399.38	-	18-5-17/MU/SMM-SIG, UPLC
12	L-Tirosin	mg / kg	202.59	-	18-5-17/MU/SMM-SIG, UPLC
13	L-Prolin	mg / kg	1763.66	-	18-5-17/MU/SMM-SIG, UPLC
14	L-Threonin	mg / kg	550.66	-	18-5-17/MU/SMM-SIG, UPLC
15	L-Histidin	mg / kg	232.60	-	18-5-17/MU/SMM-SIG, UPLC

Bogor, 29 Mei 2019
PT Saraswanti Indo Genetech

Dwi Yulianto Laksono, S.Si
Manager Laboratorium

Lampiran 6. Analisis data rendemen dengan SPSS 25.

Between-Subjects Factors

		Value Label	N
Rasio	1,00	1:10	6
	2,00	1:20	6
Lama Waktu	1,00	24 jam	6
	2,00	36 jam	6

Descriptive Statistics

Dependent Variable: Hasil Rendemen

Rasio	Lama Waktu	Mean	Std. Deviation	N
1:10	24 jam	29,8867	1,23391	3
	36 jam	37,3533	1,27033	3
	Total	33,6200	4,24026	6
1:20	24 jam	39,3433	,70401	3
	36 jam	43,0633	1,35508	3
	Total	41,2033	2,25483	6
Total	24 jam	34,6150	5,25698	6
	36 jam	40,2083	3,34084	6
	Total	37,4117	5,11541	12

Levene's Test of Equality of Error Variances^{a,b}

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Hasil Rendemen	Based on Mean	,265	3	8	,849
	Based on Median	,252	3	8	,858
	Based on Median and with adjusted df	,252	3	7,080	,857

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.^{a,b}

a. Dependent variable: Hasil Rendemen

b. Design: Intercept + Faktor_A + Faktor_B + Faktor_A * Faktor_B

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Hasil Rendemen

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	276,905 ^a	3	92,302	67,520	,000
Intercept	16795,594	1	16795,594	12286,162	,000
Faktor_A	172,521	1	172,521	126,201	,000
Faktor_B	93,856	1	93,856	68,657	,000
Faktor_A * Faktor_B	10,528	1	10,528	7,701	,024
Error	10,936	8	1,367		
Total	17083,435	12			
Corrected Total	287,841	11			

Homogeneous Subsets

Hasil Rendemen

Subset for alpha = 0.05

	Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
			1	2	3
Tukey HSD ^a	1:10 * 24 jam	3	29,8867		
	1:10 * 36 jam	3		37,3533	
	1:20 * 24 jam	3		39,3433	
	1:20 * 36 jam	3			43,0633
	Sig.			1,000	,236

Lampiran 7. Dokumentasi ekstraksi kolagen.



Pemotongan kulit ikan lele



Ditimbang 100 g



Pencucian dengan air mengalir hingga pH netral



Perendaman dengan 0,1 M NaOH 1:10 (b/v) selama 6 jam suhu 4°C



Perendaman dengan 10% n-butanol 1:10 (b/v) selama 18 jam



Pencucian dengan air mengalir hingga pH netral



Penyaringan dengan kain katun 2 lapis



Ekstraksi dengan asam asetat 0,5M sesuai perlakuan



Dipresipitasi dengan NaCl hingga 0,9 M



Didiamkan hingga terbentuk endapan



Presipitat dicuci dengan 0,5 M asam asetat



Endapan disentrifuge 3500 rpm selama 30 menit



Dialisis dengan 0,1 M asam asetat dan aquades



Didapat kolagen cair



Lampiran 8. Dokumentasi pengujian SDS-PAGE.



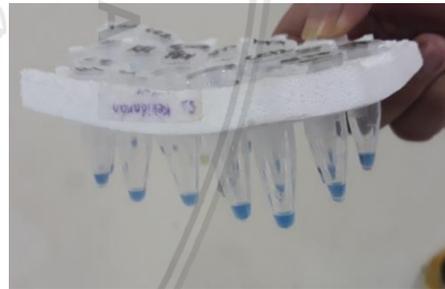
Pembuatan gel



Penambahan *Loading buffer* pada sampel



Perebusan sampel



Sampel siap di *running*



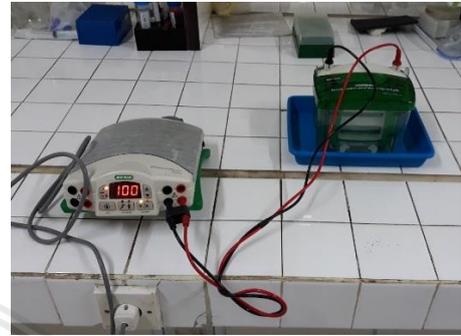
Persiapan alat untuk *running*



Menginjeksikan sampel pada gel



Pewarnaan (*staining*)



Running SDS-PAGE



Penghilangan warna (*Destaining*)

**Perhitungan Berat Molekul
Protein dengan *Software Imaging*
*Densitometer Model GS-700***

Lampiran 9. Hasil data intensitas pita protein dan berat molekul SDS-PAGE.

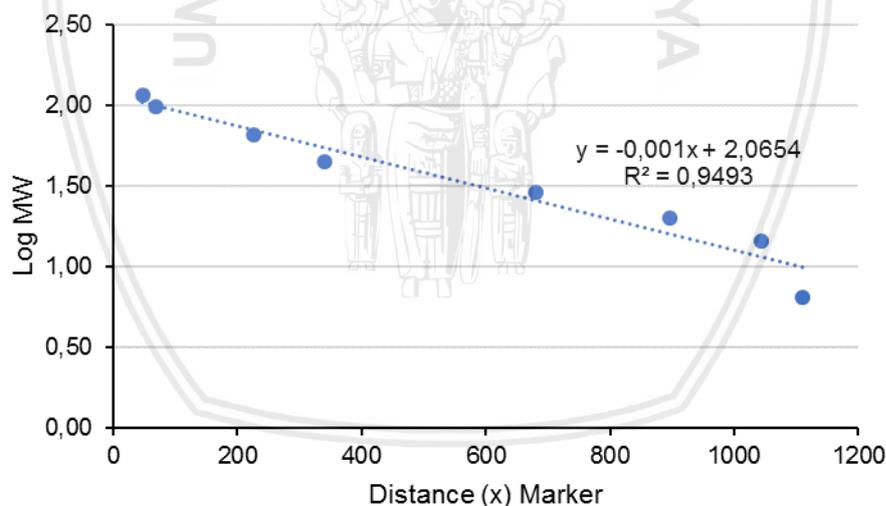
Data pita protein

No	Area	Mean	Min	Max	x	y	Sampel
1	0	0	0	0	47	232	Marker
2	0	255	255	255	68	29	
3	0	255	255	255	227	25	
4	0	255	255	255	341	24	
5	0	255	255	255	680	18	
6	0	0	0	0	897	207	
7	0	255	255	255	1043	21	
8	0	255	255	255	1110	25	
9	0	255	255	255	13	638	
10	0	0	0	0	21	636	A ₂ B ₂
11	0	255	255	255	89	972	
12	0	255	255	255	123	995	
13	0	0	0	0	215	638	
14	0	255	255	255	295	637	
15	0	255	255	255	345	892	
16	0	0	0	0	478	638	
17	0	0	0	0	620	635	
18	0	0	0	0	693	634	
19	0	0	0	0	747	834	
20	0	255	255	255	944	640	
21	0	255	255	255	1029	639	
22	0	0	0	0	22	1205	A ₂ B ₁
23	0	255	255	255	64	1207	
24	0	255	255	255	139	1540	
25	0	255	255	255	229	1206	
26	0	0	0	0	343	1437	
27	0	255	255	255	436	1424	
28	0	0	0	0	470	1209	
29	0	0	0	0	531	1205	
30	0	0	0	0	603	1239	
31	0	255	255	255	768	1208	
32	0	255	255	255	952	1451	
33	0	255	255	255	990	1405	
34	0	255	255	255	11	1775	A ₁ B ₂
35	0	255	255	255	47	1775	
36	0	0	0	0	148	2087	
37	0	0	0	0	305	2030	
38	0	255	255	255	355	1776	
39	0	255	255	255	455	1776	

40	0	255	255	255	513	1775
41	0	0	0	0	544	1772
42	0	0	0	0	814	1775
43	0	0	0	0	1032	1772
44	0	255	255	255	15	2379
45	0	0	0	0	55	2482
46	0	255	255	255	116	2637
47	0	0	0	0	196	2414
48	0	255	255	255	272	2566
49	0	0	0	0	352	2345
50	0	0	0	0	449	2396
51	0	255	255	255	528	2348
52	0	255	255	255	635	2368
53	0	0	0	0	707	2397
54	0	255	255	255	867	2583
55	0	0	0	0	950	2480
56	0	0	0	0	1031	2617

A₁B₁

Penentuan berat molekul



Marker					
No	MW	Distance (x) marker	Log MW	a (grafik)	b (grafik)
1	116	47	2,06	-0,001	2,0654
2	97,4	68	1,99	-0,001	2,0654
3	66	227	1,82	-0,001	2,0654
4	45	341	1,65	-0,001	2,0654
5	29	680	1,46	-0,001	2,0654
6	20,1	897	1,30	-0,001	2,0654
7	14,4	1043	1,16	-0,001	2,0654
8	6,5	1110	0,81	-0,001	2,0654

A ₂ B ₂		
Distance	RF	kDa
13	2,05	112,82
21	2,04	110,76
89	1,98	94,71
123	1,94	87,58
215	1,85	70,86
295	1,77	58,94
345	1,72	52,53
478	1,59	38,67
620	1,45	27,89
693	1,37	23,57
747	1,32	20,82
944	1,12	13,23
1029	1,04	10,87

A ₂ B ₁		
Distance	RF	kDa
22	2,04	110,51
64	2,00	100,32
139	1,93	84,41
229	1,84	68,61
343	1,72	52,77
436	1,63	42,60
470	1,60	39,39
531	1,53	34,23
603	1,46	29,00
768	1,30	19,83
952	1,11	12,98
990	1,08	11,90

A ₁ B ₂		
Distance	RF	kDa
11	2,05	113,34
47	2,02	104,33
148	1,92	82,68
305	1,76	57,60
355	1,71	51,33
455	1,61	40,78
513	1,55	35,68
544	1,52	33,22
814	1,25	17,84
1032	1,03	10,80

A ₁ B ₁		
Distance	RF	kDa
15	2,05	112,31
55	2,01	102,42
116	1,95	89,00
196	1,87	74,03
272	1,79	62,14
352	1,71	51,69
449	1,62	41,34
528	1,54	34,47
635	1,43	26,94
707	1,36	22,82
867	1,20	15,79
950	1,12	13,04
1031	1,03	10,82

