

**PENGARUH PERBEDAAN RASIO BERAT KULIT IKAN BADER  
(*Barbonymus gonionotus*) DENGAN ASAM ASETAT DAN LAMA WAKTU  
EKSTRAKSI TERHADAP RENDEMEN SERTA KARAKTERISTIK KOLAGEN**

**SKRIPSI**

Oleh:

**MUHAMMAD RESTU BAIHAQI  
NIM. 155080307111018**



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

**PENGARUH PERBEDAAN RASIO BERAT KULIT IKAN BADER  
(*Barbonymus gonionotus*) 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:

**MUHAMMAD RESTU BAIHAQI  
NIM. 155080307111018**



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

**SKRIPSI**

**PENGARUH PERBEDAAN RASIO BERAT KULIT IKAN BADER  
(*Barbonymus gonionotus*) DENGAN ASAM ASETAT DAN LAMA WAKTU  
EKSTRAKSI TERHADAP RENDEMEN SERTA KARAKTERISTIK KOLAGEN**

Oleh:

**MUHAMMAD RESTU BAIHAQI  
NIM. 155080307111018**

Telah dipertahankan didepan penguji  
Pada tanggal 10 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. Muhammad Firdaus, MP**  
NIP. 19680919 200501 1 001

Tanggal: 22 OCT 2019



**IDENTITAS TIM PENGUJI**

Judul : **PENGARUH PERBEDAAN RASIO BERAT KULIT IKAN BADER (*Barbonymus gonionotus*) DENGAN ASAM ASETAT DAN LAMA WAKTU EKSTRAKSI TERHADAP RENDEMEN SERTA KARAKTERISTIK KOLAGEN**

Nama Mahasiswa : Muhammad Restu Baihaqi  
NIM : 155080307111018  
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. Titik Dwi Sulistiyati, MP  
Dosen Penguji 2 : Bayu Kusuma, S.Pi, M.Sc  
Tanggal Ujian : 10 Oktober 2019

## PERNYATAAN ORISINALITAS

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali yang tertulis dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka. Apabila kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil plagiasi, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut, sesuai hukum di Indonesia.



Malang, Oktober 2019

Mahasiswa

Muhammad Restu Baihaqi

NIM. 155080307111018

## UCAPAN TERIMAKASIH

Dalam penyelesaian penyusunan laporan penelitian skripsi ini penulis mendapatkan banyak bimbingan dan bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, dalam kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Allah SWT, yang selalu memberikan kesehatan dan kekuatan kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.
2. Kedua orang tua penyusun yang telah mendukung dan memberikan do'a dalam penyelesaian skripsi ini.
3. Dr. Ir. Happy Nursyam, MS, selaku dekan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya.
4. Dr. Sc. Asep Awaludin P., S.Pi, MP selaku dosen pembimbing skripsi.
5. Abdul Aziz Jaziri, S.Pi, M.Sc selaku dosen pembimbing skripsi.
6. Dr. Ir. Titik Dwi Sulistiyati, MP selaku dosen penguji skripsi.
7. Bayu Kusuma, S.Pi, M.Sc selaku dosen penguji skripsi.
8. Bapak dan Ibu Dosen Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang.
9. Tomo, Sabrina, Cichaf dan Ayuning selaku teman satu tim dalam kegiatan penyelesaian skripsi ini.
10. Segenap teman bimbingan Bicky, Khozin, Rica, Fisep, Yessy, Cichaf, Sabrina, Tomo, Ayuning yang telah bekerja sama dalam penyelesaian skripsi ini.
11. Teman-teman yang selalu memberikan semangat dan dukungan baik secara langsung maupun tidak langsung.

Malang, Oktober 2019

Penulis

## RINGKASAN

**MUHAMMAD RESTU BAIHAQI. 155080307111018.** Pengaruh Perbedaan Rasio Berat Kulit Ikan Bader (*Barbonymus gonionotus*) 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**).

Pemanfaatan limbah kulit ikan sebagai bahan baku kolagen merupakan salah satu alternatif peningkatan nilai tambah limbah industri perikanan, sekaligus mengurangi dampak negatif terhadap lingkungan. Kolagen, umumnya diisolasi dari jaringan kulit hewan darat (sapi dan babi), tetapi bahaya penyakit *bovine spongiform encephalopathy* (BSE) serta penyakit kuku dan mulut dari jaringan kulit sapi dan penggunaan babi serta turunannya yang diharamkan oleh masyarakat muslim. Salah satu alternatif yang dapat dimanfaatkan adalah kulit ikan bader (*Barbonymus gonionotus*). Ikan bader merupakan ikan non ekonomis yang sebagian besar hanya dimanfaatkan bagian dagingnya saja, namun limbah dari ikan bader salah satunya limbah kulit ikan bader kurang dimanfaatkan. Kualitas kolagen dipengaruhi oleh metode ekstraksi, seperti rasio pemakaian asam dan lama waktu ekstraksi. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menentukan pengaruh perbedaan rasio berat kulit ikan bader dengan asam asetat dan lama waktu ekstraksi terhadap rendemen dan karakteristik kolagen.

Metode yang digunakan pada penelitian ini yaitu metode eksperimen digunakan untuk parameter rendemen dan metode deskriptif digunakan untuk parameter karakteristik yaitu FTIR (*Fourier Transform InfraRed*), berat molekul SDS-PAGE, komposisi asam amino. Rancangan percobaan dalam penelitian adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial dengan menggunakan dua faktor. Faktor pertama adalah rasio berat kulit ikan dengan asam asetat (A). Faktor kedua adalah lama waktu ekstraksi asam asetat (B) dengan tiga kali ulangan. Data yang diperoleh dari penelitian metode eksperimen dilakukan analisis terhadap rendemen kolagen kulit ikan bader. kemudian dilakukan analisis ANOVA dengan aplikasi SPSS 25.0. dilanjutkan dengan uji *tuckey* untuk menentukan notasi. Setelah mendapatkan rendemen tertinggi dilakukan karakterisasi berupa FTIR, SDS-PAGE dan komposisi asam amino.

Hasil penelitian kolagen kulit ikan bader menunjukkan rasio asam asetat dan lama waktu perendaman asam asetat berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) terhadap rendemen yang dihasilkan. Rendemen tertinggi didapatkan pada perlakuan  $A_2B_2$  yaitu rasio 1:20 (b/v) dengan lama waktu ekstraksi 36 jam senilai 52,54 %. Sedangkan rendemen terendah didapatkan pada perlakuan  $A_1B_1$  rasio 1:10 (b/v) dengan lama waktu ekstraksi 24 jam senilai 42,17 %. Karakteristik kolagen dari kulit ikan bader berdasarkan analisis FTIR didapatkan semua perlakuan memiliki gugus fungsi khas kolagen yaitu amida A, amida B, amida I, amida II dan amida III. Hasil SDS-PAGE menunjukkan berat molekul kolagen kulit ikan bader memiliki struktur  $\alpha_1$  dan  $\alpha_2$ , dengan nilai berkisar antara 99,45-108,72 kDa. Hasil analisis komposisi asam amino tertinggi pada glisin sebesar 26,64 %, prolin sebesar 12,60 %, asam glutamat 11,74 %, arginin 11,03 % dan alanin 10,36 %.

Kesimpulan dari penelitian ini adalah rasio 1:20 (b/v) memiliki nilai rendemen lebih tinggi dari rasio 1:10 (b/v) dan lama waktu ekstraksi asam asetat 36 jam memiliki nilai rendemen lebih tinggi dari lama waktu ekstraksi 24 jam. Berdasarkan karakteristik diatas, hasil ekstraksi kulit ikan bader memenuhi syarat sebagai kolagen.

## KATA PENGANTAR

*Asalamualaikum Wr. Wb*

Dengan memanjatkan puji syukur kehadiran Allah SWT, atas limpahan rahmat, rizki dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan laporan skripsi dengan judul “Pengaruh Perbedaan Rasio Berat Kulit Ikan Bader (*Barbonymus gonionotus*) 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 bahwa atas keterbatasan ilmu dan pengetahuan dalam penyusunan laporan skripsi ini, maka diharapkan adanya kritik dan saran yang membangun agar menjadi lebih baik lagi. Penulis berharap semoga laporan skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak. Amin.

*Wasssalamu'alaikum Wr. Wb*

Malang, Oktober 2019

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>IDENTITAS TIM PENGUJI .....</b>	<b>iv</b>
<b>PERNYATAAN ORISINALITAS .....</b>	<b>v</b>
<b>UCAPAN TERIMAKASIH .....</b>	<b>vi</b>
<b>RINGKASAN .....</b>	<b>vii</b>
<b>KATA PENGANTAR .....</b>	<b>viii</b>
<b>DAFTAR ISI .....</b>	<b>ix</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>xi</b>
<b>DAFTAR GAMBAR .....</b>	<b>xii</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	<b>xiii</b>
<b>1. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Perumusan Masalah .....	4
1.3 Tujuan .....	4
1.4 Hipotesis .....	4
1.5 Kegunaan .....	5
1.6 Tempat dan Waktu Pelaksanaan .....	5
<b>2. TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>6</b>
2.1 Klasifikasi Ikan bader ( <i>Barbonymus gonionotus</i> ) .....	6
2.2 Morfologi Ikan bader ( <i>Barbonymus gonionotus</i> ) .....	7
2.3 Kolagen .....	8
2.3.1 Pengertian kolagen .....	8
2.3.2 Karakteristik kolagen .....	9
2.3.3 Struktur Kolagen .....	10
2.3.4 Tipe Kolagen .....	11
2.3.5 Sumber kolagen .....	12
2.3.6 Ekstraksi kolagen .....	13
2.3.7 Komposisi asam amino kolagen .....	15
2.3.8 Manfaat kolagen .....	17
<b>3. METODE PENELITIAN .....</b>	<b>19</b>
3.1 Materi Penelitian .....	19
3.1.1 Bahan Penelitian .....	19
3.1.2 Alat Penelitian .....	19
3.2 Metode Penelitian .....	19
3.2.1 Variabel Penelitian .....	20
3.2.2 Rancangan Penelitian .....	21
3.3 Tahap Penelitian .....	22
3.3.1 Penelitian tahap 1 .....	22
3.3.2 Penelitian Tahap 2 .....	25
3.4 Analisis pengujian .....	25
3.4.1 Nilai Rendemen Kolagen .....	25
3.4.2 Analisis FTIR (Veeruraj, 2013) .....	25
3.4.3 Analisis SDS-PAGE (Singh, <i>et al.</i> 2011) .....	26
3.4.4 Analisis komposisi asam amino (SIG, 2019) .....	27

<b>4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>28</b>
4.1 Rendemen Kolagen .....	28
4.2 <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> (FTIR) Kolagen.....	31
4.3 Berat Molekul (SDS-PAGE) Kolagen .....	35
4.4 Komposisi Asam Amino Kolagen .....	37
<b>5. KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>	<b>40</b>
5.1 Kesimpulan.....	40
5.2 Saran.....	40
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>41</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>45</b>



## DAFTAR TABEL

<b>Tabel</b>	<b>Halaman</b>
1. Ekstraksi kolagen kulit ikan air tawar dengan asam asetat.....	14
2. Komposisi asam amino kolagen kulit ikan nila .....	16
3. Rancangan Penelitian (RAL) faktorial .....	21
4. Karakteristik gugus fungsi kolagen dari kulit ikan bader .....	31
5. Komposisi asam amino kolagen kulit ikan bader .....	38



## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Morfologi Ikan bader ( <i>Barbonyumus gonionotus</i> ).....	6
2. Struktur kolagen <i>triple helix</i> .....	11
3. Metode ekstraksi kolagen modifikasi (Kittiphattanabawon, <i>et al.</i> 2005). ....	23
4. Grafik rata-rata persentase rendemen kolagen .....	29
5. Hasil spektrum <i>infrared</i> kolagen dari kulit ikan bader. ....	32
6. Pita protein kolagen dari kulit ikan bader.....	36



## DAFTAR LAMPIRAN

<b>Lampiran</b>	<b>Halaman</b>
1. Ekstraksi kolagen.....	45
2. Diagram alir preparasi sampel SDS-PAGE .....	47
3. Diagram alir pengujian SDS-PAGE .....	48
4. Data rendemen .....	49
5. Data Pengujian FTIR .....	50
6. Data Hasil Pengujian Asam Amino .....	54
7. Analisis data rendemen dengan SPSS 25. ....	57



## 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan negara kepulauan yang memiliki potensi sumber daya perikanan yang sangat besar. Hasil perikanan tersebut tidak hanya dipasarkan dalam bentuk segar, tetapi diolah menjadi produk yang lebih tinggi. Pada proses produksinya, industri pengolahan perikanan seringkali menghasilkan limbah dalam jumlah yang melimpah. Total limbah pengolahan hasil perikanan sebesar 30%. Produksi perikanan nasional menurut KKP mencapai 23,26 juta ton pada 2017. Jika dihitung maka limbah yang dihasilkan 6,99 juta ton. Limbah perikanan tersebut terdiri dari limbah cair dan limbah padat. Limbah cair berupa darah, lendir, dan lemak. Sedangkan limbah padat berupa kepala, sirip, kulit, tulang, jeroan dan sisik. Saat ini limbah perikanan tersebut sangat sedikit pemanfaatannya, biasanya dimanfaatkan menjadi tepung ikan dari limbah padat yang digunakan sebagai bahan baku utama pada pembuatan pakan ternak. Padahal limbah perikanan memiliki nilai tambah yang tinggi karena dapat digunakan sebagai bahan baku pembuatan kolagen.

Kolagen merupakan protein utama penyusun struktur jaringan ikat golongan vertebrata dengan proporsi sekitar 30% dari total protein tubuh manusia. (Chai, *et al.* 2010). Kolagen merupakan struktur serat protein (20-30%) dari keseluruhan protein yang terdapat pada tubuh hewan vertebrata, tepatnya pada matriks ekstraseluler dan jaringan penghubung hewan. Kolagen dapat ditemukan pada kornea, tulang, pembuluh darah, tulang rawan dan dentin gigi (Wang, *et al.* 2008). Kolagen digunakan sebagai bahan baku dalam industri makanan, kosmetik, pembuatan film, biomaterial dan farmasi. Kolagen, umumnya diisolasi dari jaringan kulit hewan darat (sapi dan babi), tetapi bahaya penyakit *bovine spongiform encephalopathy* (BSE) akibat dari jaringan kulit sapi

(Yamaguchi, 2002), serta penggunaan babi dan turunannya diharamkan oleh masyarakat muslim dunia. Kondisi ini memberikan peluang besar untuk pemanfaatan kulit ikan sebagai sumber kolagen.

Salah satu hasil perikanan yang bisa menjadi alternatif bahan baku kolagen adalah kulit ikan bader. Ikan bader (*Barbonymus gonionotus*) merupakan salah satu spesies ikan air tawar yang hidup didaerah tropis. Ikan bader memiliki daging yang tebal serta berpotensi untuk dibudidayakan karena mampu beradaptasi pada kondisi lingkungan dengan kisaran salinitas yang luas. Ikan bader biasanya hanya diolah menjadi olahan makanan yang hanya diambil dagingnya saja, sehingga menyisakan limbah berupa kepala, tulang, jeroan, kulit dan sisik. Berdasarkan observasi di lapangan, Limbah kulit ikan bader memiliki rendemen 30% dari 10 kg total ikan utuh. Namun limbah kulit tersebut tidak ada penanganan maupun pengolahannya. Oleh karena itu, jika kulit ikan bader dapat dimanfaatkan dengan baik, maka akan berpotensi sebagai sumber kolagen potensial serta aman dan halal dikonsumsi masyarakat untuk dijadikan sumber alternatif pengganti kolagen dari babi dan sapi. Serta, dapat mengurangi dampak negatif terhadap lingkungan.

Untuk mendapatkan kolagen bisa dilakukan dengan metode ekstraksi menggunakan asam atau *acid soluble collagen* (ASC) atau ekstraksi menggunakan enzim atau *pepsin soluble collagen* (PSC). 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 dengan konsentrasi rendah seperti asam asetat. Jaswir, *et al.* (2011), menyatakan bahwa Perendaman kulit ikan di dalam asam asetat mengakibatkan kulit ikan akan mengembang. Hal tersebut terjadi akibat penetrasi air ke dalam struktur kulit. Penggunaan larutan asam asetat akan meningkatkan ion  $H^+$ , kondisi tersebut

membantu air masuk ke dalam struktur kulit melalui gaya elektrostatik antara gugus polar (pengembangan elektrostatik) atau ikatan hidrogen antara gugus polar dan atom negatif (hidrasi liotropik). Pembengkakan struktur kulit ikan ini penting karena berpengaruh terhadap utuhnya struktur serat tropokolagen menjadi prokolagen melalui terganggunya ikatan non kovalen dan pada akhirnya memudahkan kelarutan kolagen pada proses ekstraksi. Asam asetat memiliki gugus karboksil (-COOH) yang dapat berikatan dengan gugus amina (-NH) dari protein kolagen sehingga memudahkan proses ekstraksi kolagen.

Isolasi kolagen sudah cukup banyak dilakukan, pada penelitian sadowska, *et al.* (2003), ekstraksi kolagen ikan dengan perbandingan rasio asam asetat yang berbeda menunjukkan pengaruh yang signifikan terhadap hasil ekstraksi kolagen dari kulit baltic cod (*Gadus morhua*). Menurut Wang, *et al.* (2008), ekstraksi kolagen dari kulit ikan *grass carp* (*Ctenopharyngodon idella*) menunjukkan 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 yaitu 19,18 mg/g yang diamati setelah 36 jam perendaman.

Rendemen merupakan persentase kolagen berdasarkan nilai bahan baku awal. perbedaan nilai rendemen pada kolagen yang dihasilkan dapat disebabkan oleh perbedaan metode ekstraksi, konsentrasi larutan untuk menghilangkan protein non kolagen, jenis bahan, suhu dan lama waktu produksi (Potaros, *et al.* 2009). Pada penelitian Duan, *et al.* (2008), untuk ekstraksi kolagen kulit dari ikan mas (*Cyprinus carpio*) dengan konsentrasi asam asetat, waktu dan suhu yang berbeda menunjukkan pengaruh yang signifikan pada ekstraksi kolagen yang larut dalam asam, dengan hasil rendemen 41,3%. Hasil kolagen terlarut meningkat dengan meningkatnya konsentrasi asam asetat atau suhu ke nilai tertentu.

Karakteristik kolagen merupakan sifat penting untuk mengetahui potensi yang terdapat pada kolagen tersebut. Kolagen yang dihasilkan dari perlakuan pada penelitian tahap sebelumnya dilakukan karakterisasi. Karakteristik meliputi rendemen, analisis termal dengan *differential scanning calorimetry* (DSC) (Martianingsih dan Atmaja, 2009), gugus fungsi dengan FTIR (Muyonga, *et al.* 2004). analisis asam amino dengan HPLC (AOAC, 1995) dan analisis berat molekul dengan SDS-PAGE (Sigh, *et al.* 2011)

Berdasarkan informasi diatas, isolasi kolagen dari kulit ikan bader (*barbonymus gonionotus*) dengan metode ekstraksi asam atau *acid soluble collagen* (ASC) bertujuan untuk menentukan pengaruh perbedaan rasio berat kulit ikan bader dengan asam asetat dan lama waktu ekstraksi terhadap rendemen dan karakteristik kolagen.

## 1.2 Perumusan Masalah

Bagaimana pengaruh perbedaan rasio berat kulit ikan bader (*Barbonymus gonionotus*) dengan asam asetat dan lama waktu ekstraksi terhadap rendemen dan karakteristik kolagen ?

## 1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian adalah untuk menentukan pengaruh perbedaan rasio berat kulit ikan bader (*Barbonymus gonionotus*) dengan asam asetat dan lama waktu ekstraksi terhadap rendemen dan karakteristik kolagen.

## 1.4 Hipotesis

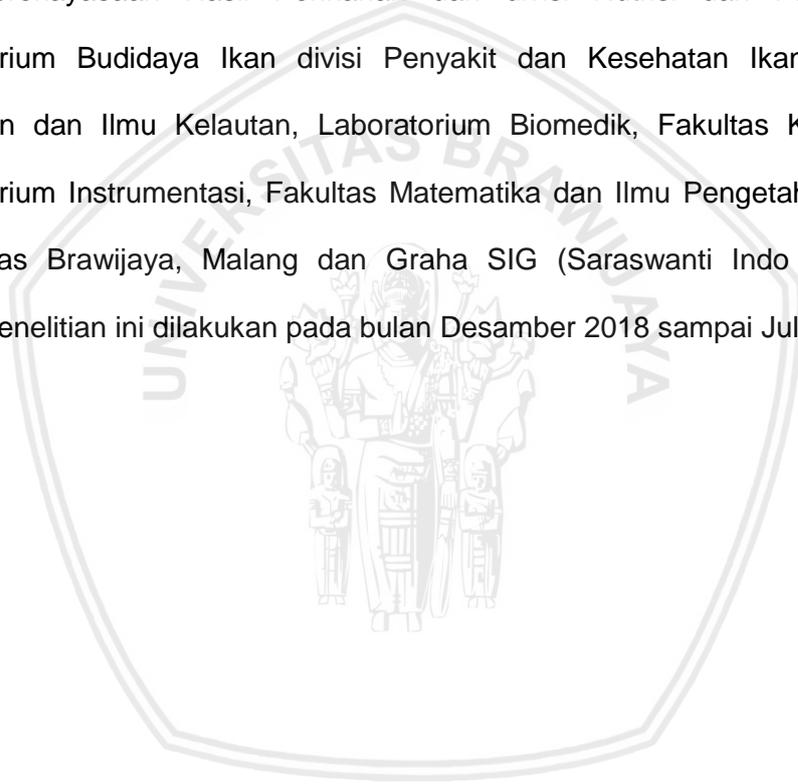
Hipotesis dari penelitian yang dilakukan adalah perbedaan rasio berat kulit ikan bader (*Barbonymus gonionotus*) dengan asam asetat dan lama waktu ekstraksi berpengaruh terhadap rendemen dan karakteristik kolagen.

### 1.5 Kegunaan

Kegunaan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh perbedaan rasio berat kulit ikan bader (*Barbonymus gonionotus*) dengan asam asetat dan lama waktu ekstraksi terhadap rendemen dan 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, 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 bader (*Barbonymus gonionotus*)

Ikan bader (*Barbonymus gonionotus*) merupakan salah satu ikan asli perairan umum Indonesia dan telah lama dikenal sebagai ikan konsumsi penting. Menurut Herawati (2015), ikan bader merupakan ikan herbivora, daun-daunan merupakan pakan yang penting bagi bader.

Ikan bader merupakan jenis ikan herbivora atau pemakan tumbuhan (Kottelat, *et al.* 1993). Ikan bader termasuk salah satu ikan air tawar yang mampu hidup di air payau dengan salinitas 7 ppt. Oleh karena itu, ikan air tawar dapat dibudidayakan, di tambak, waduk, bendungan dan perairan umum dapat dilakukan dengan sistem jaring terapung dan keramba. menurut Nelson (2006), Klasifikasi ikan bader adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Animalia
Phyllum	: Chordata
Sub Phylum	: Vertebrata
Super Kelas	: Pisces
Kelas	: Actinopterygii
Ordo	: Cypriniformes
Superfamili	: Cyprinoidea
Famili	: Cyprininae
Sub Famili	: Cyprininae
Genus	: Barbonimus
Spesies	: <i>Barbonymus gonionotus</i>

Morfologi ikan bader (*Barbonymus gonionotus*) dapat dilihat pada Gambar 1.



**Gambar 1.** Morfologi Ikan bader (*Barbonymus gonionotus*) (Data primer, 2018)

## 2.2 Morfologi Ikan bader (*Barbonymus gonionotus*)

Ikan bader tergolong kedalam keluarga *cyprinidae*, bentuk tubuhnya hampir mirip dengan ikan mas dan ikan nilem. Bentuk tubuh ikan bader agak memanjang, pipih ke samping, bentuk punggung membusur sehingga kelihatan seperti segitiga. Tinggi badan ikan ini 1 : 2,4 – 2,6 kali panjang standar. Moncong runcing, mulut terletak di ujung tengah, kecil dan mempunyai dua pasang sungut yang sangat kecil. Permukaan sirip punggung seperti jari-jari. Sirip dubur bercagak, permukaan sirip ini berhadapan dengan sisi linear latelaris ke 19. Sirip ekor juga bercagak dalam (simetris) dengan lobus membulat. Sisik garis rusuk (linear literalis) berjumlah 29-31 buah. Sisik relatif besar dengan warna putih keperak - perak, dibagian punggung warna lebih gelap sedangkan dibagian perut berwarna lebih putih ( Herawati, 2015).

Ikan bader termasuk ke dalam famili *cyprinidae* seperti ikan mas dan ikan nilem. Bentuk badan agak panjang dan pipih dengan punggung meninggi, kepala kecil, moncong meruncing, mulut kecil terletak pada ujung hidung, sungut sangat kecil atau rudimenter. Di bawah garis rusuk terdapat sisik  $5\frac{1}{2}$  buah dan  $3-3\frac{1}{2}$  buah di antara garis rusuk dan permukaan sirip perut. Garis rusuknya sempurna berjumlah antara 29-31 buah. Badan berwarna keperakan agak gelap di bagian punggung. Pada moncong terdapat tonjolan-tonjolan yang sangat kecil. Sirip punggung dan sirip ekor berwarna abu-abu atau kekuningan, dan sirip ekor bercagak dalam dengan lobus membulat, sirip dada berwarna kuning dan sirip dubur berwarna oranye terang. Sirip dubur mempunyai  $6\frac{1}{2}$  jari-jari bercabang (Kottelat, *et al.* 1993). Sisik dengan struktur beberapa jari-jari sejajar atau melengkung ke ujung, sedikit atau tidak ada proyeksi jari-jari ke samping. Ada tonjolan sangat kecil, memanjang dari tulang mata sampai ke moncong dan dari dahi ke antara mata. Sirip dubur mempunyai  $6\frac{1}{2}$  jari-jari bercabang,  $3-3\frac{1}{2}$  sisik antara gurat sisi dan awal sirip perut (Kottelat, *et al.* 1993).

## 2.3 Kolagen

Kolagen merupakan salah satu jenis protein fibriliar yang mengandung 30% protein dari total protein dalam tubuh, yang berfungsi sebagai bahan penyusun tubuh karena bersifat melekatkan sel untuk membentuk kerangka jaringan dan organ tubuh.

### 2.3.1 Pengertian kolagen

Kolagen merupakan material yang mempunyai kekuatan rentang dan struktur yang berbentuk serat. Protein jenis ini banyak terdapat dalam vertebrata tingkat tinggi. Hampir sepertiga protein dalam tubuh vertebrata berada sebagai kolagen. Semakin besar hewan, semakin besar pula bagian total protein yang merupakan kolagen. Kolagen juga merupakan komponen serat utama dalam tulang, gigi, tulang rawan, lapisan kulit dalam (dermis), tendon (urat daging) dan tulang rawan. Bahan di bagian dalam lensa mata dapat dikatakan tersusun dari kolagen murni. Kolagen ada dalam semua organ yang menampilkan kekuatan dan kekakuan (Katili, 2009).

Kolagen adalah komponen utama lapisan kulit dermis (bagian bawah epidermis) yang dibuat oleh sel fibroblas. Pada dasarnya kolagen adalah senyawa protein rantai panjang yang tersusun lagi atas asam amino alanin, arginin, lisin, glisin, prolin, serta hidroksiprolin. Sebelum menjadi kolagen, terlebih dahulu terbentuk pro kolagen (Hartati dan Kurniasari, 2010). Kolagen merupakan protein penting yang menghubungkan sel dengan sel yang lain. Sepertiga dari protein yang terkandung dalam tubuh manusia terdiri dari kolagen. Fungsi dari kolagen pada tubuh berbeda-beda tergantung pada lokasinya. Namun demikian, kolagen sangat diperlukan dalam menjaga kemudaan dan kesehatan (Hartati dan Kurniasari, 2010).

Kolagen adalah protein serabut yang memberikan kekuatan dan fleksibilitas pada jaringan dan tulang serta memegang peranan penting bagi jaringan lainnya, termasuk kulit dan tendon. Senyawa ini merupakan protein utama yang menyusun komponen matrik ekstraseluler. Kolagen tersusun atas *triple helix* dari tiga rantai  $\alpha$  polipeptida, mengandung dua jenis turunan asam amino yang tidak langsung dimasukkan selama proses translasi. Struktur *triple helix* kolagen berasal dari tiga asam amino utama, yakni *glycine*, *proline*, dan *hydroxyproline* (Setyowati dan Setyani, 2015).

### 2.3.2 Karakteristik kolagen

Jika dididihkan di dalam air, kolagen akan mengalami transformasi, dari bentuk untaian, tidak larut dan tidak tercerna menjadi gelatin, yaitu campuran polipeptida yang larut yang merupakan dasar pembentuk gelatin. Perubahan ini melibatkan hidrolisis beberapa ikatan kovalen pada kolagen, karena kolagen pada jaringan pengikat dan pembuluh yang menjadikan daging berbentuk liat. Kolagen mengandung kira-kira 35% glisin dan kira-kira 11% alanin; persentasi asam amino ini agak luar biasa tinggi. Yang lebih menonjol adalah kandungan prolin dan 4-hidroksiprolin yang tinggi, yaitu asam amino yang jarang ditemukan pada protein selain pada kolagen dan elastin. Bersama-sama, prolin dan hidroksiprolin mencapai kira-kira 21% dari residu asam amino pada kolagen (Katili, 2009).

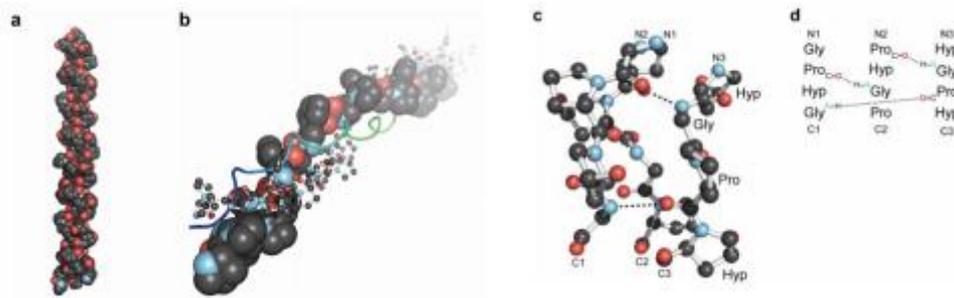
Kolagen tersusun dari asam amino yang bervariasi dan berbeda-beda antar spesies. Akan tetapi secara umum kolagen tersusun dari 3 asam amino utama yaitu glisin, prolin, dan alanin. Glisin menyusun hampir dua pertiga struktur kolagen sedangkan sisanya merupakan asam amino yang lain (Chi, *et al.* 2014). Kolagen tipe I umumnya terdiri dari 15 hingga 17 asam amino. Asam amino sistein tidak ditemukan pada kolagen. Asam glutamat lebih banyak ditemukan

dari sumber hewan laut dibandingkan mamalia darat (Jongjareonrak, *et al.* 2005). Kolagen merupakan sumber asam amino yang tidak lengkap karena tidak memiliki asam amino triptofan. Kolagen dari tipe I hingga tipe 28 tidak ditemukan adanya asam amino tersebut (Kaddler, *et al.* 2007).

### 2.3.3 Struktur Kolagen

Struktur kolagen tersusun atas tiga tingkat seperti pada (Gambar 2) yakni :

1. Kerangka kovalen terdiri dari rantai-rantai protein individual dengan bobot molekular sebesar kira-kira 100.000 masing-masing. Residu asam amino yang paling berlimpah adalah glisin, atas tanggung jawab 33% dari residu asam amino total yang ada. Prolin juga berlimpah (12%) dan juga ada asam-asam amino yang tidak umum, hidroksiprolin dan hidroksilisin.
2. Tiga rantai bergabung untuk membentuk tripel heliks dalam struktur sekunder. Tripel heliks ini merupakan satuan struktural dasar dari kolagen dan disebut tropokolagen. Tropokolagen merupakan batang berdiameter 15 Å dan panjang 3000 Å. Dalam heliks tropokolagen ketiga benang terikat hidrogen satu dengan yang lain dengan perantaraan gugus peptida -NH dari residu glisin dan gugus peptida -C=O pada rantai lain. Ini merupakan struktur heliks yang berbeda nyata dari  $\alpha$ -heliks.
3. Satuan tropokolagen yang terangkakan secara kovalen yang kemudian membentuk satu ikatan atau berkas yang disebut mikrofibril. Kolagen fibril dapat terbentuk dalam ikatan paralel, dalam hal pembentukan urat, atau dalam lembaran-lembaran seperti ikatan pembentukan kertas dan dalam hal pembentukan kulit (Setyowati dan Setyani, 2015).



**Gambar 2.** Struktur kolagen *triple helix* (Setyowati dan Setyani, 2015).

### 2.3.4 Tipe Kolagen

Kolagen dengan konformasi tripel heliks telah teridentifikasi sebanyak 29 varian, yaitu tipe I – XXIX (Liu, *et al.* 2010). Tipe-tipe kolagen tersebut terdapat pada berbagai macam jaringan, antara lain: tipe I terdapat pada kebanyakan jaringan ikat seperti tulang, kulit, tendon dan pembuluh darah, tipe II terdapat pada kartilago dan bagian virus mata, tipe III terdapat pada pembuluh darah, tipe IV terdapat pada membran basalis semua organ, tipe V terdapat pada tendon, mata dan jaringan interstisial, tipe VI terdapat pada hati, ginjal, dan perikondrium, tipe VII terdapat pada pertemuan epidermis dengan dermis, tipe VIII terdapat pada sel endotelial, tipe IX terdapat pada kartilago, tipe X terdapat pada kartilago hipertrofik dan kartilago yang dimineralkan, tipe XI terdapat pada kartilago, tipe XII terdapat pada tendon dan kolagen fibril terasosiasi, tipe XIII terdapat pada epidermis, folikel rambut, sel sel pada akar kuku, tipe XIV sama seperti tipe I, tipe XV terdapat pada banyak jaringan yaitu kapiler, testis, ginjal, jantung, tipe XVI terdapat pada dermis, ginjal, tipe XVII terdapat pada hemidesmosom dan kulit, tipe XVIII terdapat pada hati dan ginjal, tipe XIX terdapat pada dasar membran, tipe XX terdapat pada kornea mata, tipe XXI pada perut, ginjal, tipe XXII pada persimpangan jaringan, tipe XXIII pada retina, jantung, tipe XXIV pada tulang, kornea, tipe XXV otak, testis, tipe XXVI pada jaringan embrionik, tipe XXVII pada tulang rawan, pada XVIII terdapat pada trans

membran, tipe kolagen XXIX terdapat pada tendon (Nurhayati dan Peranginangin, 2009).

Berdasarkan strukturnya, kolagen terbagi menjadi enam kelompok yaitu kolagen fibrillar, jaringan, fibril terasosiasi (FACIT), rangkaian mutiara, verankerungsfibrillen, dan transmembran. Kolagen fibrillar terdiri dari kolagen tipe I, II, III, V dan XI. Sedangkan kolagen tipe IV (lamina densa dari dasar membran hemidesmosom), VIII, dan X. Kolagen fibril terasosiasi (FACIT) terdiri dari kolagen tipe IX, XII, XIV, dan XXII. Kolagen berbentuk rangkaian mutiara yaitu kolagen tipe VI. Kolagen verakerungsfibrillen yaitu kolagen tipe VII, dan kolagen dengan domain transmembran yaitu kolagen tipe XIII, XVII, XXIII dan XXV (Nurhayati dan Peranginangin, 2009).

### 2.3.5 Sumber kolagen

Kolagen komersial biasanya diperoleh dari kulit sapi, kulit babi, atau kulit ayam, tetapi penggunaannya kurang tepat mengingat pertimbangan agama dan kontaminasi biologis seperti BSE (*bovine spongiform encephalopathy*), TSE (*transmissible spongiform encephalopathy*), FMD (*foot and mouth disease*) dan sebagainya. Kandungan asam amino yang tinggi pada hewan yang hidup darat juga menyebabkan proses denaturasi lebih cepat sehingga kualitas kolagennya juga rendah (Aberoumand, 2012). Di sisi lain, pendayagunaan kolagen yang berasal dari hewan yang hidup di air, seperti ikan dapat menjadi alternatif yang menjanjikan. Ekstrak kolagen dapat berperan sebagai kosmetik dan obat, serta residunya (*hydrolysate*) dapat dimanfaatkan dalam industri makanan sebagai pelembut makanan. Kolagen yang berasal dari sisik ikan dapat digunakan untuk menyembuhkan luka bakar dan perbaikan jaringan (Setyowati dan Setyani, 2015).

### 2.3.6 Ekstraksi kolagen

Kolagen dapat diekstrak dari kulit (Ahmad dan Benjakul 2010; Singh, *et al.* 2010; Kittiphattanabawon, *et al.* 2005), sisik (Li, *et al.* 2008; Matmaroh, *et al.* 2011; Zhang, *et al.* 2011), dan tulang (Kittiphattanabawon, *et al.* 2005). Ekstraksi kolagen dapat dilakukan dengan asam atau basa. Proses asam cocok digunakan untuk bahan baku yang memiliki struktur kolagen dengan sedikit ikatan silang, misalnya babi dan kulit ikan; sedangkan proses basa umumnya digunakan untuk bahan baku yang memiliki ikatan silang lebih padat dan kompleks seperti tulang dan kulit sapi (Karim dan Bhat, 2009). Zhou dan Regenstein (2005), menunjukkan *pretreatment* untuk menghilangkan protein nonkolagen menggunakan NaOH dengan konsentrasi 0,01 mol/L OH dan 0,1 mol/L OH. Deproteinasi kulit dan tulang bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*) menggunakan 0,1 N NaOH 1:10 (b/v) selama 6 jam dilanjutkan dengan *defatted* dengan butil alkohol 10% 1:10 (b/v) selama 18 jam, kemudian kolagen diekstrak dengan CH<sub>3</sub>COOH 0,5 M 1:30 (b/v) selama 24 jam (Kittiphattanabawon, *et al.* 2005).

Kolagen juga dapat diekstrak dengan kombinasi asam dan enzim. Beberapa jenis enzim yang dapat digunakan adalah pepsin, tripsin, pankreatin, fisin, bromelin dan papain (Skierka dan Sadowska, 2007). Ekstraksi kolagen dari kulit ikan menurut Schimdt, *et al.* (2016), dapat dengan menggunakan hidrolisis asam atau *acid soluble collagen* (ASC) dan *pepsin soluble collagen* (PSC). (Alhana, *et al.* 2015).

Ekstraksi kolagen menggunakan asam asetat dengan berbagai sampel kulit ikan air tawar dari beberapa sumber dapat dilihat pada Tabel 1.

**Tabel 1.** Ekstraksi kolagen kulit ikan air tawar dengan asam asetat

Bahan Baku	Pelarut Ekstraksi	Rasio dan lama waktu	Yield	Karakteristik	Referensi
Ikan patin ( <i>Pangasianodon hypophthalmus</i> )	Asam asetat 0,5M	1:15 (b/v), 24 jam	5,1% berat kering	- Asam amino : glisin;30.9%, prolin;12%, alanin;11.6% - FTIR: amida A, B, I, II dan III (3321, 2926, 1651, 1551,1242 cm <sup>-1</sup> ) - berat molekul: 116 kDa Struktur α1 dan α2	Singh, <i>et al.</i> 2011
Ikan nila ( <i>Oreochromis niloticus</i> )	Asam asetat 0,5M	-1:50 (b/v), 3 hari -1:30 (b/v), 2 hari	39,4% berat basah	- Asam amino: glisin; 35,6%, prolin;12,8%, alanin;11,9% - FTIR: - - Berat molekul: <116 kDa Struktur α1, α2, α3	Zeng, <i>et al.</i> 2009
Ikan mas ( <i>Cyprinus carpio</i> )	Asam asetat 0,5 M	1:5 (b/v), 3 hari	41,3% berat basah	- Asam amino: glisin; 33,2%, prolin; 11,4%, alanin; 11,8% - FTIR: amida A, B, I, II dan III (3324,33; 2854 1649,5; 1540 dan 1235 cm <sup>-1</sup> ) -berat molekul: <116 kDa Struktur α1 dan α2	Duan, <i>et al.</i> 2009
Ikan nila ( <i>Oreochromis niloticus</i> )	Asam Asetat 0,5 M		27,2% Berat Basah	-Asam amino: glisin; 28,7%, prolin; 12,7%, alanin; 14,1%. - FTIR: amida A, B, I, II dan III (3321,55; 2924,26; 1652,22; 1554,92; 1244,23 cm <sup>-1</sup> ) - berat molekul: <140 kDa Struktur α1 dan α2	Chen, <i>et al.</i> 2016
Ikan Nila ( <i>Oreochromis niloticus</i> )	Asam Asetat 0,5 M	1:70 (b/v), 24 jam	48,21 % Berat basah	- Asam amino: glisin; 25,15%, prolin; 11%, alanin; 10,4%. - - berat molekul:>160 kDa struktur α1 dan α2	Noitup, <i>et al.</i> 2005

### 2.3.7 Komposisi asam amino kolagen

Asam amino merupakan struktur pembentuk protein. Asam amino terdiri dari sebuah gugus amino ( $\text{NH}_2$ ), sebuah gugus karboksil ( $\text{COOH}$ ), sebuah atom hidrogen dan gugus R (rantai cabang) yang terikat pada sebuah atom karbon (Winarno, 2008). Kolagen merupakan komponen struktural utama dari jaringan ikat yang meliputi hampir 30 % dari total protein tubuh. Molekul dasar kolagen terbentuk dari tiga rantai polipeptida yang saling berpilin membentuk struktur triple heliks dengan susunan asam amino yang khas yaitu Gly-X-Y, pada posisi X adalah prolin dan posisi Y adalah hidroksiprolin (Friess, 1998).

Kolagen mengandung asam amino prolin, glisin, alanin, asam glutamat dan hidroksiprolin dalam jumlah besar (Ogawa, *et al.* 2004). Kolagen juga mengandung metionin, tirosin dan histidin tetapi dalam jumlah kecil serta tidak memiliki triptofan atau sistein (Muyonga, *et al.* 2004). Keberadaan sistein pada kolagen yang dihasilkan menunjukkan deproteinisasi belum berjalan optimal sehingga memungkinkan adanya keberadaan asam amino sistein (Nalinanon, *et al.* 2011).

Kandungan prolin dan hidroksiprolin merupakan asam amino yang berfungsi dalam meningkatkan stabilitas kolagen (Wong, 1989). Tamilmozhi, *et al.* (2013) menyatakan bahwa prolin merupakan asam amino yang unik pada kolagen karena berperan dalam menjaga integritas struktural kolagen. glisin merupakan asam amino utama pembentuk kolagen yang meliputi 30% dari total asam amino (Kittiphattanabawon, *et al.* 2005).

Komposisi asam amino, dinyatakan sebagai residu per 1000 total residu. Kolagen dari kulit dan tulang memiliki glisin sebagai asam amino utama. Berdasarkan pengamatan kandungan alanin, prolin, asam glutamat, dan hidroksiprolin yang relatif tinggi. Komposisi asam amino kolagen dari kulit sedikit berbeda dengan komposisi kolagen dari tulang. Dibandingkan dengan kolagen

dari tulang, kolagen dari kulit mengandung jumlah hidroksiprolin, prolin dan arginin yang lebih tinggi tetapi jumlah glisin dan hidroksilisin yang lebih rendah. Kandungan glisin dari kolagen dari kulit dan tulang adalah sekitar 30% dari total asam amino (Burghagen, 1999; Foegeding, *et al.* 1996; Pearson and Young, 1989; Wong, 1989). kolagen ikan memiliki kandungan asam amino yang lebih rendah daripada kolagen mamalia. Kandungan asam amino dari kolagen hewan berkorelasi dengan habitatnya (Foegeding, *et al.* 1996; Rigby, 1968) Tingkat hidroksilasi prolin dalam kolagen dari kulit dan tulang masing-masing adalah 39,9% dan 41,1%. Kolagen dari kulit dan tulang memiliki derajat hidroksilasi lisin masing-masing 24,4% dan 44,4%. Oksidasi prolin dan lisin menjadi residu terhidroksilasi masing-masing dikatalisis oleh prolin hidroksilasi dan lisin hidroksilasi (Burghagen, 1999; Foegeding, *et al.* 1996; Pearson and Young, 1989; Wong, 1989). Dari hasilnya, hidroksilasi prolin dan lisin dalam kolagen dari tulang sedikit lebih besar dari pada kolagen dari kulit. Prolin terhidroksilasi berperan dalam menstabilkan *triple helix* (Ramachandran, 1988) dan lisin terhidroksilasi berkontribusi pada pembentukan dan stabilisasi *cross-link*, sehingga menimbulkan ikatan yang kompleks dan tidak terhidrolisa (Asghar and Henrickson, 1982; Stimler and Tanzer, 1977). Hasil penelitian menunjukkan bahwa kolagen dari tulang mungkin memiliki struktur yang sedikit lebih kompleks daripada dari kulit seperti yang ditunjukkan oleh semakin tinggi tingkat hidroksilasi (Kittiphattanabawon, *et al.* 2005).

Menurut Zeng (2009), Hasil komposisi asam amino kolagen dari kulit ikan air tawar yaitu kulit ikan nila (*Oreochromis niloticus*) dapat dilihat pada Tabel 2.

**Tabel 2.** Komposisi asam amino kolagen kulit ikan nila (*Oreochromis niloticus*)

Amino acid	Kolagen Kulit (%)
Aspartic acid	4.2
Hydroxyproline	8.2
Threonine	2.2
Serine	3.2
Glutamic acid	6.9
Proline	12.8
Glycine	35.6
Alanine	11.9
Valine	1.7
Methionine	0.5
Isoleucine	0.8
Leucine	2
Tyrosine	0.3
Phenylalanine	1.3
Lysine	2
Histidin	0.6
Arginine	5.8
Total	100

Sumber: Zeng, 2009

### 2.3.8 Manfaat kolagen

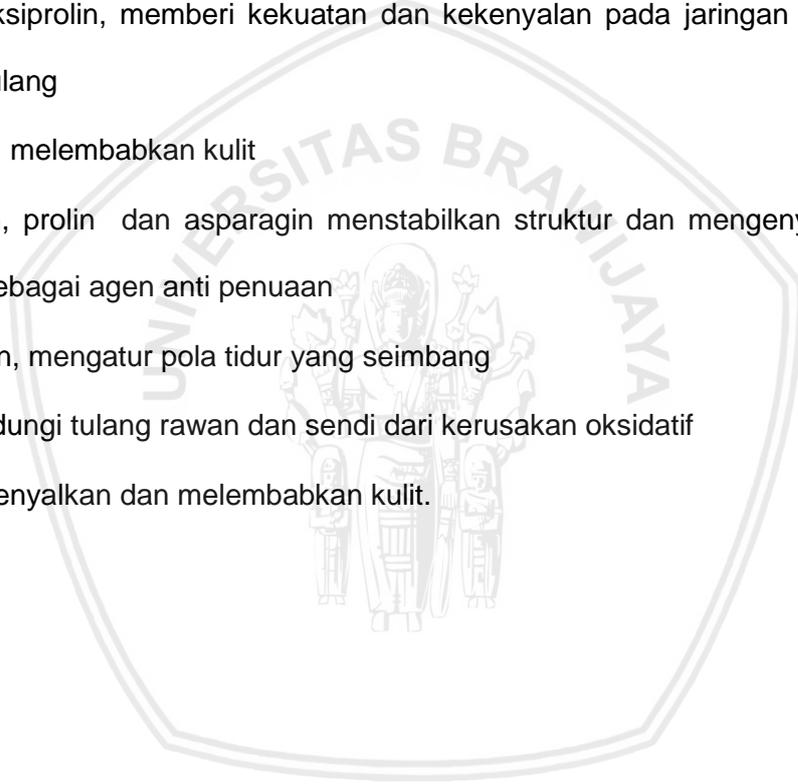
Kolagen diketahui mempunyai banyak manfaat pada dunia medis dan farmasi. Pemanfaatan dan aplikasi kolagen antara lain untuk penanganan penderita hipertensi, permasalahan urinari, sakit yang berkaitan dengan osteoarthritis, rekayasa jaringan untuk implantasi pada manusia, dan penghambatan penyakit angiogenik, seperti komplikasi diabetes, obesitas, dan arthritis (Rehn, *et al.* 2001). Kolagen juga dapat diaplikasikan dalam bidang pangan (*edible casing*), kosmetik (krim kulit, shampo, produk-produk perawatan rambut, cat kuku), dan medis (perbanyakkan plasma/ pemekar, agen hemostatik, material benang bedah, perbaikan katup prostensis, perbaikan selaput mata, hemodialisis, tulang buatan, pembentukan oksigen membran, dan pemulihan operasi organ-organ yang rusak (esofagus, trakea). (Sahubawa dan Putra, 2011)

Kolagen di pasaran digunakan sebagai bahan baku dalam industri makanan, kosmetik, pembuatan film, biomaterial dan farmasi. Pada industri farmasi kolagen digunakan sebagai *drug carrier* yaitu mini-pellet dan tablet untuk

penghantar protein, formulasi gel pada kombinasi dengan liposom untuk sistem penghantar terkontrol, bahan pengontrol untuk penghantaran transdermal dan nanopartikel untuk penghantaran gen (Nurhayati, *et al.* 2013).

Menurut Kadler, *et al.* (2007) manfaat kolagen dalam tubuh yaitu menghasilkan asam amino penting diantaranya:

- Lisin, prolin dan glisin secara khusus diperlukan oleh tubuh untuk membentuk struktur jaringan penyokong, dan untuk menjaga fungsi sel
- Hidroksiprolin, memberi kekuatan dan kekenyalan pada jaringan penyokong dan tulang
- Glisin, melembabkan kulit
- Alanin, prolin dan asparagin menstabilkan struktur dan mengenyalkan kulit dan sebagai agen anti penuaan
- Arginin, mengatur pola tidur yang seimbang
- Melindungi tulang rawan dan sendi dari kerusakan oksidatif
- Mengenyalkan dan melembabkan kulit.



### 3. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Materi Penelitian

Materi penelitian pada penelitian ini terdiri dari bahan penelitian dan alat penelitian.

##### 3.1.1 Bahan Penelitian

Bahan penelitian utama yang digunakan dalam pembuatan kolagen kulit ikan bader (*Barbonymus gonionotus*) adalah kulit ikan bader (*Barbonymus gonionotus*) dengan rendemen kulit 30 % dari 10 kg total ikan utuh yang berasal dari tambak di daerah gresik, 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% gliserol),  $\beta$ -Mercaptoethanol ( $\beta$ -ME), Bahan-bahan lain sebagai pendukung diantaranya yaitu kain katun, kertas label, tisu.

##### 3.1.2 Alat Penelitian

Alat penelitian yang digunakan untuk pembuatan kolagen kuit ikan bader (*Barbonymus gonionotus*) adalah baskom, talenan, pisau, sendok, *cutter*, gunting, timbangan digital, penggaris, beaker glass 1000 mL, beaker glass 500 mL, gelas ukur, spatula, *magnetic stirrer*, pipet volume, bola hisap, kain blancu, kain katun, corong, corong *buchner*, cuvet, *sentrifuge*, *micro sentrifuge*, *falcon tube*, *apendoft*, *bluetip*, *yellowtip*, kulkas, *freezer*, benang kasur, *hot plate*.

#### 3.2 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen dan metode deskriptif. Penelitian eksperimen menurut Yusuf (2014),

merupakan satu-satunya tipe penelitian yang lebih akurat atau teliti dibandingkan dengan tipe penelitian yang lain dalam menentukan relasi hubungan sebab akibat. Penelitian eksperimental merupakan suatu bentuk penelitian dimana variabel dimanipulasi sehingga dapat dipastikan pengaruh dan efek variabel tersebut terhadap variabel lain yang diselidiki atau diobservasi. Metode eksperimental pada penelitian ini digunakan untuk parameter rendemen.

Penelitian deskriptif (*descriptive research*) adalah suatu metode penelitian yang ditujukan untuk menggambarkan fenomena-fenomena yang ada, yang berlangsung pada saat ini atau saat yang lampau (Sukmadinata, 2008).

Pada penelitian ini metode deskriptif digunakan untuk parameter karakteristik kolagen yaitu FTIR, SDS-PAGE dan Asam amino.

### 3.2.1 Variabel Penelitian

Variabel penelitian menurut Siyoto dan Sodik (2015), merupakan sesuatu yang menjadi objek pengamatan penelitian, sering juga disebut sebagai faktor yang berperan dalam penelitian atau gejala yang akan diteliti. Variabel-variabel dimaksud antara lain: variabel bebas dan variabel terikat.

Variabel bebas adalah variabel yang mempengaruhi, menjelaskan, atau menerangkan variabel yang lain. Variabel bebas ini mampu mempengaruhi variabel terikat (Yusuf, 2014). Ditambahkan Siyoto dan Sodik (2015), variabel bebas sering disebut *independent*, variabel stimulus, prediktor, *antecedent*. Variabel bebas adalah variabel yang mempengaruhi atau yang menjadi sebab perubahannya atau timbulnya variabel terikat.

Variabel terikat adalah variabel yang dipengaruhi atau diterangkan oleh variabel lain tetapi tidak dapat mempengaruhi variabel yang lain (Yusuf, 2014). Variabel terikat menurut Siyoto dan Sodik (2015), Variabel terikat atau dependen atau disebut variabel output, kriteria, konsekuen, adalah variabel yang

dipengaruhi atau yang menjadi akibat, karena adanya variabel bebas. Variabel terikat tidak dimanipulasi, melainkan diamati variasinya sebagai hasil yang dipradugakan berasal dari variabel bebas. Biasanya variabel terikat adalah kondisi yang hendak kita jelaskan.

Dalam penelitian ini yang menjadi variabel bebas yaitu rasio berat kulit ikan bader dengan asam asetat 1 : 10 (w/v) dan 1 : 20 (w/v) dan lama waktu ekstraksi asam asetat 24 jam dan 36 jam. Sedangkan variabel terikat meliputi nilai rendemen, komposisi asam amino, FTIR (*Fourier Transform InfraRed*), berat molekul SDS-PAGE.

### 3.2.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial menggunakan dua faktor. Faktor pertama adalah rasio berat kulit ikan bader dengan asam asetat (A). Faktor kedua adalah lama waktu ekstraksi asam asetat (B), dengan 4 perlakuan dan 3 kali ulangan serta uji beda nyata jujur (BNJ) atau uji *tuckey* dengan soft ware SPSS 25.0.

Adapun model rancangan percobaan dapat dilihat pada Tabel 3 sebagai berikut.

**Tabel 3.** Rancangan Penelitian (RAL) faktorial

A	B	Ulangan			Total	Rata-rata
		1	2	3		
1 : 10 (w/v)	24 jam					
1 : 20 (w/v)	36 jam					

Keterangan:

A : Rasio berat kulit ikan dengan asam asetat.

B : Lama waktu ekstraksi.

Penelitian ini menggunakan analisa data statistik dengan metode *Analysis of Variance* (ANOVA) dengan model analisa sebagai berikut:

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

keterangan :

$Y_{ijk}$  = Karakterisasi kolagen yang dihasilkan.

$\mu$  = Nilai tengah umum.

$\alpha_i$  = Pengaruh taraf ke-i dari faktor (A).

$\beta_j$  = 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.

$\epsilon_{ijk}$  = Pengaruh sisa (galat percobaan) taraf ke-i dari faktor A dan taraf ke-j dari faktor B pada ulangan yang ke-k.

Hasil yang diperoleh dari penelitian ini, kemudian dilakukan analisis ANOVA dengan aplikasi SPSS 25.0. Jika analisis keragaman menunjukkan adanya perbedaan nyata pada selang kepercayaan 95% ( $p < 0,05$ ) maka dilanjutkan dengan uji *tuckey* untuk menentukan notasi.

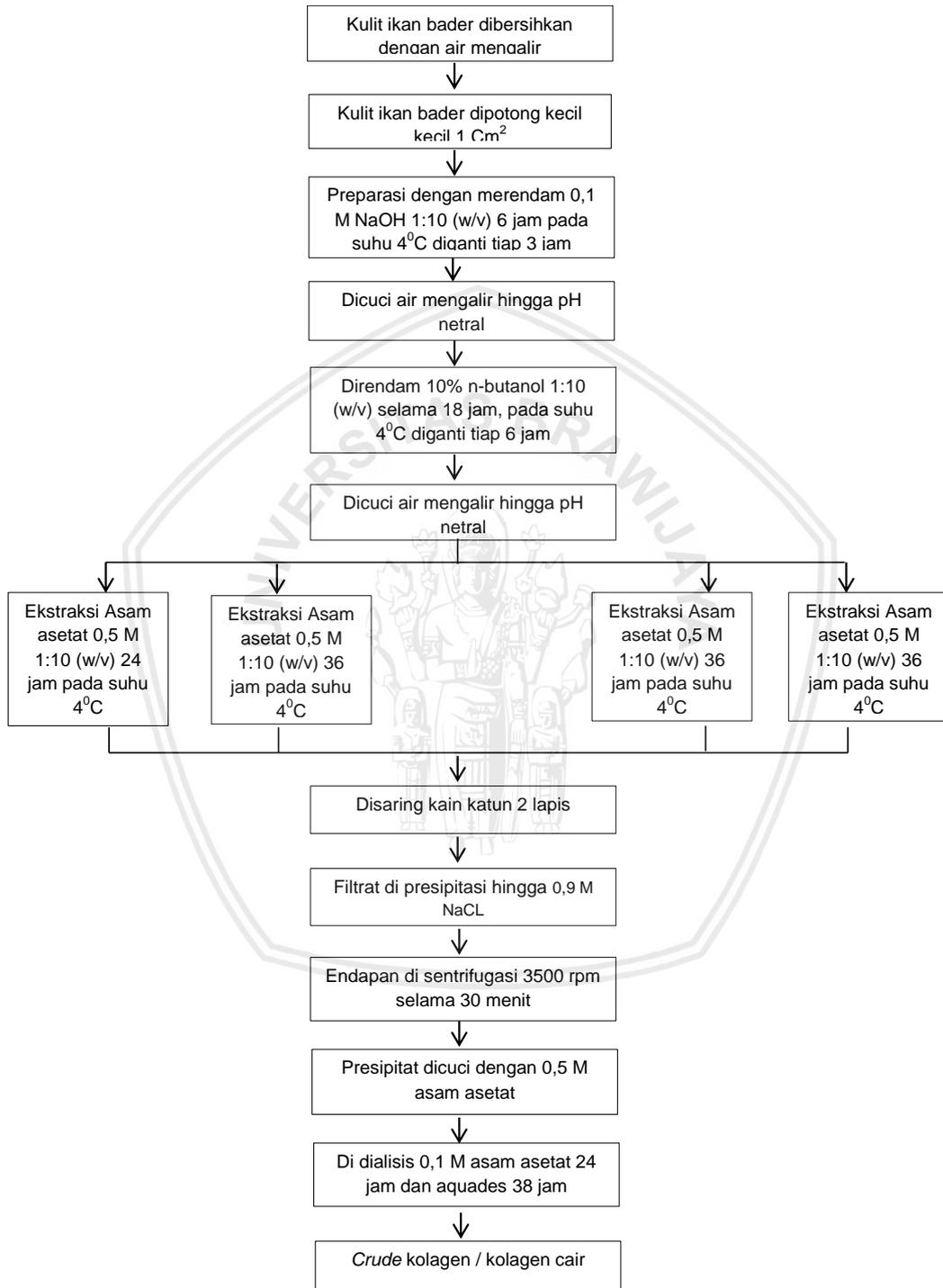
### 3.3 Tahap Penelitian

Tahap penelitian ini dibagi menjadi dua tahap yaitu penelitian tahap 1 dan penelitian tahap 2.

#### 3.3.1 penelitian tahap 1

Penelitian tahap 1 bertujuan untuk menganalisis dan mendapatkan ekstrak kolagen dari limbah kulit ikan bader (*Barbonymus gonionotus*) melalui metode ekstraksi 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 Gambar 3.



**Gambar 3.** Metode ekstraksi kolagen, modifikasi (Kittiphattanabawon, *et al.* 2005)

### A. Preparasi Sampel

Pada tahap preparasi sampel kulit ikan bader (*Barbonymus gonionotus*) dibersihkan dari sisa-sisa daging yang menempel dan sisa-sisa sisik yang masih menempel pada kulit, kemudian kulit dibersihkan dengan air mengalir dengan tujuan menghilangkan sisa sisik maupun kotoran yang masih menempel pada kulit, kemudian kulit dipotong kecil-kecil (1 Cm<sup>2</sup>) untuk memperluas permukaan. Semua tahapan dilakukan pada suhu 4°C. Kemudian kulit yang dipotong kecil direndam dengan larutan NaOH konsentrasi 0.1 M rasio 1:10 (w/v) selama 6 jam untuk menghilangkan protein *non* kolagen kulit bader, sesekali dilakukan pengadukan agar homogen dan larutan diganti setiap 3 jam. Kemudian sampel dicuci / dibilas dengan air mengalir hingga pH sampel netral, selanjutnya sampel kulit ikan bader direndam dengan n-butanol rasio 1:10 (w/v) selama 18 jam untuk menghilangkan lemak sesekali dilakukan pengadukan agar homogen dan larutan diganti setiap 6 jam sekali. Kemudian sampel dicuci dengan membilas menggunakan air mengalir hingga pH sampel netral, setelah itu dilakukan ekstraksi menggunakan metode ASC (*Acid Soluble Collagen*).

### B. Ekstraksi Kolagen Menggunakan Asam

Pada tahap ekstraksi sampel kulit ikan bader yang sudah di preparasi pada suhu 4°C sampel direndam menggunakan asam asetat 0,5 M rasio 1:10 dan 1:20 (w/v) selama 24 jam dan 36 jam, sesekali dilakukan pengadukan agar homogen. Kemudian dilakukan penyaringan menggunakan kain katun 2 lapis dengan menggunakan corong *buchner*. Kemudian sampel yang sudah disaring dipresipitasi dengan NaCl hingga konsentrasi 0,9 M hingga terbentuk filtrat. Kemudian disimpan pada suhu 4 °C hingga terbentuk endapan. Setelah terbentuk endapan selanjutnya sampel disentrifugasi 3500 rpm selama 30 menit.

Kemudian residu hasil sentrifuge diambil dan kemudian presipitat dicuci menggunakan asam asetat 0,5 M. Kemudian didialisis dengan asam asetat 0,1 M selama 24 jam dan dialisis dengan aquades selama 48 jam dan setiap 6 jam aquades diganti. Kemudian didapatkan *crude* kolagen atau kolagen cair.

### 3.3.2 Penelitian Tahap 2

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

### 3.4 Analisis pengujian

Analisis pengujian yang dilakukan pada penelitian ekstraksi kolagen dari kulit ikan bader (*Barbonymus gonionotus*) adalah nilai rendemen, FTIR (*Fourier Transform InfraRed*), berat molekul (SDS-PAGE) dan komposisi asam amino.

#### 3.4.1 Nilai Rendemen Kolagen

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

$$\text{Rendemen (100\%)} = \frac{\text{Berat akhir}}{\text{Berat awal}} \times 100\%$$

#### 3.4.2 Analisis FTIR (Veeruraj, 2013)

Sampel kolagen cair sebelum di FTIR dilakukan treatment terlebih dahulu dengan cara 2 ml sampel kolagen cair diupkan kandungan airnya pada *hotplate* suhu 80°C hingga tersisa sedikit, lalu didapatkan endapan kolagen murni.

Kemudian analisis FTIR dilakukan menggunakan mesin FTIR *Spectrophotometer* (8400S/Shimadzu).

Sampel kolagen dianalisis menggunakan spektra *fourier transform infrared* (FTIR). Sampel kolagen yang diliofilisasi (3 mg) dicampur dengan KBr kering (100 mg), ditumbuk dalam mortar dan alu dan mengalami tekanan sekitar  $5 \times 10^6$  Pa. diletakkan dalam cetakan untuk menghasilkan cakram transparan bening  $13 \times 1$  mm. Intensitas penyerapan puncak dihitung dengan metode garis dasar. Spektra yang dihasilkan dianalisis dengan menggunakan perangkat lunak ORIGIN 8.0 (Thermo Nicolet, USA) (Veeruraj, 2013).

### 3.4.3 Analisis SDS-PAGE (Singh, *et al.* 2011)

Analisis uji *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 2 dan diagram pengujian sampel dapat dilihat pada Lampiran 3.

SDS-PAGE dilakukan dengan mengikuti metode Singh, *et al.* (2011), Sampel dilarutkan dalam 5% SDS dan campuran kemudian diinkubasi pada suhu  $85^\circ\text{C}$  selama 1 jam dalam *waterbath* yang dikontrol suhu. Campuran disentrifugasi pada 4000 g selama 5 menit menggunakan *microcentrifuge* pada suhu kamar untuk menghilangkan puing-puing yang tidak larut. Supernatan yang diperoleh dicampur dengan bufer (Tris HCl 60 mM, pH 6,8, mengandung 2% SDS dan 25% gliserol) dengan rasio 1:1 (v/v) dan mengandung 10%  $\beta$ -merkaptotanol ( $\beta$ -ME). Campuran itu disimpan dalam air mendidih selama 2 menit. Sampel (15  $\mu\text{L}$ ) dimasukkan ke dalam gel poliakrilamida yang terdiri dari 7,5% separating gel dan 4% stacking gel dan dikenakan elektroforesis pada konstanta arus 15 mA / gel selama 1 jam dan 30 menit menggunakan unit Mini Protein II. Setelah elektroforesis, gel diwarnai dengan 0,05% (b / v) *Coomassie*

*blue* R-250 dalam 15% (v / v) metanol dan 5% (v / v) asam asetat dan diurai dengan 30% (v / v) metanol dan 10% (v / v) asam asetat. Molekul tinggi penanda berat digunakan untuk memperkirakan berat molekul protein. Penanda yang digunakan adalah miosin (200 kDa),  $\alpha$ -macroglobulin (170 kDa),  $\beta$ -galactosidase (116 kDa), transferrin (76 kDa) dan glutamat dehydrogenase (53 kDa). Analisis kuantitatif intensitas pita protein dilakukan menggunakan Model *GS-700 Imaging densitometer* dengan *molecular analyst software* versi 1.4 (sistem analisis gambar).

#### **3.4.4 Analisis komposisi asam amino (SIG, 2019)**

Pengujian asam amino dengan metode *ultra performance liquid chromatography* (UPLC) analisis asam amino menggunakan UPLC terdiri beberapa tahap yaitu, sampel ditimbang sebanyak 0.1 g kemudian dihancurkan dan dimasukkan ke tabung reaksi tertutup. Larutan sampel ditambah HCL 6 N sebanyak 5-10 mL, dihidrolisis dalam oven pada suhu 110 °C selama 22 jam, lalu didinginkan pada suhu kamar dan dipindahkan ke labu takar 500 mL. Kemudian ditambahkan aquabides hingga tanda batas dan disaring dengan *filter* 0,45  $\mu$ L dan dipipet 10  $\mu$ L, tambahkan 70  $\mu$ L *AccQ Fluor Borat* dan divortex. Kemudian ditambahkan 20  $\mu$ L *reagen fluor* adan divortex dan didiamkan selama 1 menit dan di inkubasi selama 10 menit pada suhu 55 °C. Kemudian disuntik pada UPLC sebanyak 1  $\mu$ L dengan kondisi kromotografi menggunakan kolom *AccQ-Tag ultra C18*, temperatur 49°R, fase gerak sistem komposisi *gradient detektrom* PDA, laju alir 0,7  $\mu$ L/menit dan panjang gelombang 260 nm.

## 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

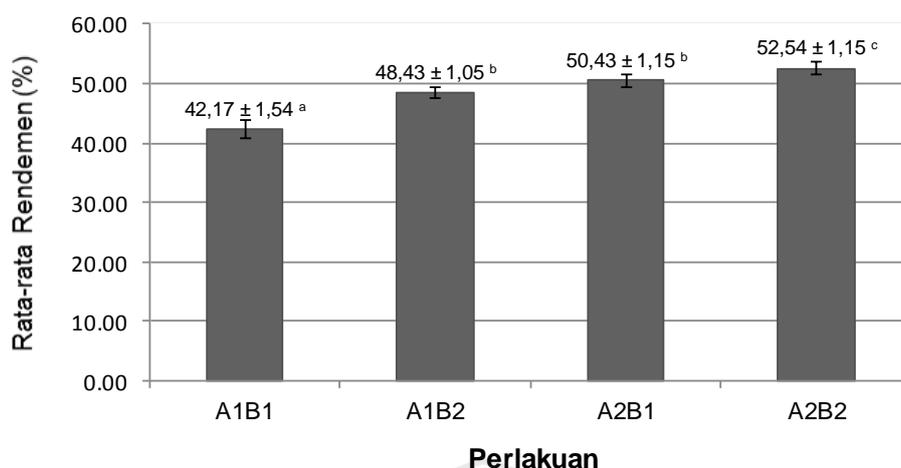
### 4.1 Rendemen Kolagen

Rendemen merupakan persentase kolagen yang dihasilkan dengan bahan baku awal. Rendemen menunjukkan bagian bahan baku yang dapat dimanfaatkan dan menjadi suatu parameter yang penting untuk mengetahui nilai ekonomis, serta keefektifan suatu bahan atau produk.

Menurut Potaros, *et al.* (2009), menyatakan bahwa perbedaan nilai rendemen pada kolagen yang dihasilkan dapat disebabkan oleh perbedaan metode ekstraksi, konsentrasi larutan untuk menghilangkan protein non kolagen, jenis bahan, suhu dan lama waktu produksi.

Tujuan analisis rendemen adalah untuk mendapatkan nilai rendemen cair tertinggi dari beberapa perlakuan rasio berat kulit ikan bader dengan asam asetat dan lama waktu ekstraksi asam asetat konsentrasi 0,5 M yang berbeda.

Hasil penelitian dengan beberapa perlakuan rasio berat kulit ikan bader dengan asam asetat dan lama waktu ekstraksi asam asetat 0,5 M yang berbeda menunjukkan kolagen dari kulit ikan bader (*Barbonymus gonionotus*) memiliki rendemen cair yang berbeda. Rata-rata persentase rendemen kolagen dari kulit ikan bader dapat dilihat pada Gambar 4.



**Gambar 4.** Grafik rata-rata persentase rendemen kolagen

Keterangan:

A<sub>1</sub>B<sub>1</sub> : Rasio kulit dengan asam asetat 1:10 lama waktu ekstraksi 24 jam

A<sub>1</sub>B<sub>2</sub> : Rasio kulit dengan asam asetat 1:10 lama waktu ekstraksi 36 jam

A<sub>2</sub>B<sub>1</sub> : Rasio kulit dengan asam asetat 1:20 lama waktu ekstraksi 24 jam

A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> : Rasio kulit dengan asam asetat 1:20 lama waktu ekstraksi 36 jam

Pada grafik rata-rata persentase rendemen diatas diketahui bahwa rata-rata rendemen dari beberapa perlakuan berbeda nyata ( $p < 0,05$ ), sehingga dilanjutkan uji *tuckey* untuk mendapatkan perlakuan yang tepat. Hasil analisis ANOVA menggunakan SPSS 25 dan uji lanjut *tuckey* dapat dilihat pada Lampiran 7. yang menunjukkan bahwa rasio dan lama waktu ekstraksi asam asetat yang menghasilkan perbedaan nyata terhadap rendemen kolagen kulit ikan bader (*Barbonymus gonionotus*) ( $p < 0,05$ ). Pada perlakuan A<sub>1</sub>B<sub>2</sub> dan A<sub>2</sub>B<sub>1</sub> menunjukkan notasi yang sama sedangkan A<sub>1</sub>B<sub>1</sub> dan A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> menunjukkan notasi yang berbeda. Hal ini menunjukkan bahwa perbedaan rasio dan lama waktu ekstraksi asam asetat menunjukkan hasil rendemen yang berbeda.

Hasil analisis menunjukkan nilai rendemen tertinggi kolagen dari kulit ikan bader (*Barbonymus gonionotus*) didapatkan pada perlakuan A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> yaitu perlakuan ekstraksi kolagen menggunakan asam asetat 0,5 M rasio 1:20 (w/v) dengan lama waktu ekstraksi 36 jam senilai 52,54%. Sedangkan rata-rata rendemen terendah

pada perlakuan A<sub>1</sub>B<sub>1</sub> yaitu perlakuan ekstraksi kolagen menggunakan asam asetat 0,5 M rasio 1:10 (w/v) dengan lama waktu ekstraksi 24 jam senilai 42,17%. Rata-rata tertinggi rendemen yang didapat lebih tinggi dari yang dilaporkan Noitup, *et al.* (2005), yang menyebutkan rendemen kolagen dari kulit ikan tawar yaitu ikan nila (*Oreochromis niloticus*) sebesar 48,21%. Rata-rata terendah rendemen yang didapat lebih tinggi dari yang dilaporkan Duan, *et al.* (2009), yaitu rendemen kulit ikan mas (*Cyprinus carpio*) sebesar 41,30%,

Hasil analisis diatas menunjukkan bahwa ekstraksi kolagen dengan penggunaan rasio berat kulit ikan bader dengan asam asetat yang berbeda menghasilkan rendemen yang berbeda juga. Rasio dengan perbandingan 1:20 (w/v) mempunyai nilai rendemen yang lebih tinggi dibandingkan dengan rasio 1:10 (w/v). Hal ini sesuai dengan pernyataan Sadowska, *et al.* (2003), bahwa ekstraksi kolagen tergantung pada perbandingan kulit dan asam, persentase rasio dari kulit ikan *baltic cod* (*Gadus morhua*) didapatkan lebih besar pada rasio 1:20 (w/v) daripada 1:10 (w/v).

Hasil diatas juga menunjukkan semakin lama waktu ekstraksi asam asetat akan menghasilkan nilai rendemen yang semakin tinggi. Lama waktu ekstraksi dengan waktu 24 jam menghasilkan rendemen lebih rendah dari lama waktu ekstraksi dengan 36 jam perendaman, 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.

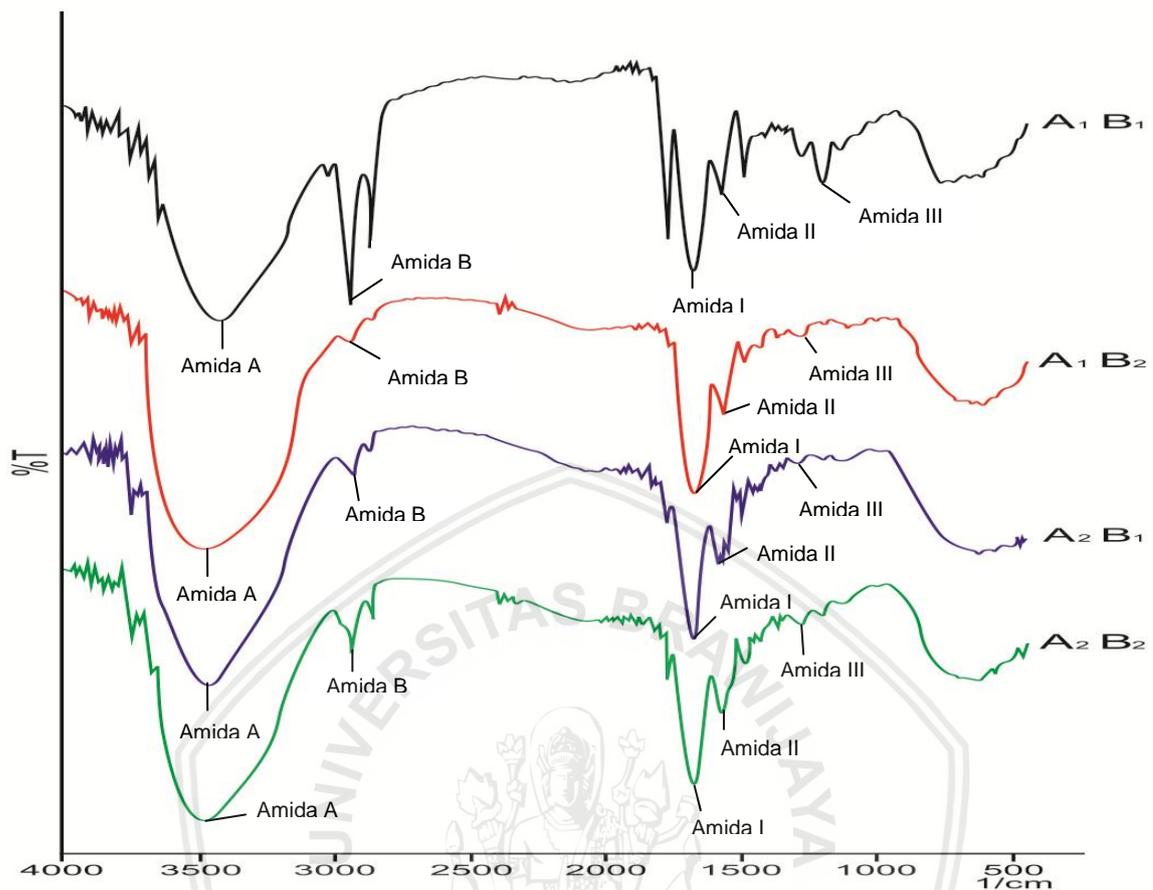
## 4.2 Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) Kolagen

Analisis FTIR (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) yang dilakukan pada penelitian ini bertujuan memastikan senyawa yang dihasilkan merupakan kolagen berdasarkan gugus-gugus fungsi penyusunnya. Struktur sekunder protein terkait erat dengan berbagai jenis ikatan hidrogen, dan melalui FTIR. Hasil spektra *infrared* kolagen kulit ikan bader (*Barbonymus gonionotus*) disajikan pada Gambar 5, sedangkan karakteristik gugus fungsi kolagen kulit ikan bader (*Barbonymus gonionotus*) hasil analisis FTIR disajikan pada Tabel 4.

**Tabel 4.** Karakteristik gugus fungsi kolagen dari kulit ikan bader

Amida	Standar Serapan (cm <sup>-1</sup> )	Serapan spektra kolagen kulit ikan bader (cm <sup>-1</sup> )				Karakteristik
		A <sub>1</sub> B <sub>1</sub>	A <sub>2</sub> B <sub>1</sub>	A <sub>1</sub> B <sub>2</sub>	A <sub>2</sub> B <sub>2</sub>	
Amida A	3400-3440 <sup>(1)</sup>	3427.27	3426.34	3423.41	3424.49	Vibrasi <i>stretching</i> NH
Amida B	2915-2935 <sup>(2)</sup>	2925.81	2927.74	2925.81	2927.74	Asimetrimetri kal <i>stretching</i> CH <sub>2</sub>
Amida I	1600-1700 <sup>(3)</sup>	1650.95	1647.10	1647.10	1649.02	Vibrasi <i>stretching</i> C=O
Amida II	1480-1575 <sup>(3)</sup>	1544.88	1550.66	1546.80	1544.88	CH <i>stretching</i> , NH <i>bending</i>
Amida III	1229-1301 <sup>(3)</sup>	1240.14	1259.43	1244.00	1245.93	CH <i>stretching</i> , NH <i>bending</i>

Sumber: <sup>(1)</sup>(Li, *et al.* 2018); <sup>(2)</sup>(Coates, 2006); <sup>(3)</sup>(Kong dan Yu, 2007)



**Gambar 5.** Hasil spektra *infrared* kolagen dari kulit ikan bader.

Berdasarkan hasil spektra *infrared* kolagen dari kulit ikan bader (*Barbonymus gonionotus*) menunjukkan bahwa puncak-puncak serapan pada wilayah amida meliputi amida A, amida B, amida I,II dan amida III yang merupakan serapan khas kolagen. Puncak serapan Amida A dikaitkan dengan getaran *stretching* NH yang terjadi pada kisaran  $3400-3440\text{ Cm}^{-1}$ , dan ketika kelompok NH peptida terlibat dalam ikatan hidrogen, posisinya bergeser ke frekuensi yang lebih rendah (Li, *et al.* 2018). Pada kolagen kulit ikan bader (*Barbonymus gonionotus*) perlakuan  $A_1B_1$ ,  $A_2B_1$ ,  $A_1B_2$  dan  $A_2B_2$  didapat spektra berturut-turut sebesar  $3427.27$ ,  $3426.34$ ,  $3423.41$ ,  $3424.49\text{ cm}^{-1}$ , Pita ini umumnya dikaitkan dengan vibrasi *stretching* NH dan mungkin menunjukkan adanya ikatan hidrogen dengan gugus karbonil dari rantai peptida. Hasil tersebut menandakan bahwa semua perlakuan sudah termasuk dalam kisaran standar

serapan yang berarti amida A terdeteksi pada bilangan gelombang masing-masing perlakuan.

Spektra FTIR kolagen kulit ikan bader (*Barbonymus gonionotus*) juga menunjukkan adanya puncak serapan pada perlakuan A<sub>1</sub>B<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>B<sub>1</sub>, A<sub>1</sub>B<sub>2</sub> dan A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> dengan bilangan gelombang masing-masing 2925.81, 2927.74, 2925.81 dan 2927.74 cm<sup>-1</sup> yang mengindikasikan adanya gugus khas kolagen, yaitu amida B. Coates (2006), menyatakan gugus amida B dengan wilayah serapan pada bilangan gelombang 2915 cm<sup>-1</sup> – 2935 cm<sup>-1</sup>. Kong dan Yu (2007), menyatakan bilangan gelombang yang mengindikasikan serapan amida B terbentuk dari asimetrikal *stretching* CH<sub>2</sub>. Hasil tersebut 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 bilangan gelombang yang terdeteksi pada kolagen dari kulit ikan bader (*Barbonymus gonionotus*) perlakuan A<sub>1</sub>B<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>B<sub>1</sub>, A<sub>1</sub>B<sub>2</sub> dan A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> yaitu 1650.95, 1647.10, 1647.10 dan 1649.02 cm<sup>-1</sup>. menunjukkan adanya vibrasi peregangan gugus C=O. Amida I merupakan gugus fungsi khas yang menyusun kolagen. Kong dan Yu (2007), menyatakan bahwa amida I terdeteksi pada kisaran bilangan gelombang 1600 cm<sup>-1</sup> – 1690 cm<sup>-1</sup>. Muyonga, *et al.* (2004) menyatakan bahwa amida I terdiri dari empat komponen struktur sekunder protein, yaitu *α-helix*, *β-sheet*, *β-turn*, dan *random coil*. Kong dan Yu (2007), mengungkapkan bahwa setiap komponen dari struktur sekunder protein memiliki wilayah serapan yang berbeda. Komponen *α-helix* ditunjukkan pada wilayah serapan bilangan gelombang 1656-1662 cm<sup>-1</sup>; *β-sheet* pada 1616 - 1637 cm<sup>-1</sup>; *β-turn* pada 1663-1696 cm<sup>-1</sup>; dan *random coil* pada 1638-1655 cm<sup>-1</sup>. Berdasarkan hasil bilangan gelombang amida I pada kolagen kulit ikan bader 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 helix* kolagen secara sempurna bertransformasi menjadi rantai tunggal  $\alpha$ -*helix* (gelatin) (Gomez-Guillén, *et al.* 2011).

Amida II yang merupakan gugus fungsi khas kolagen yang terdeteksi bilangan gelombang pada perlakuan A<sub>1</sub>B<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>B<sub>1</sub>, A<sub>1</sub>B<sub>2</sub> dan A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> berturut - turut yaitu 1544.88, 1550.66, 1546.80 dan 1544.88 cm<sup>-1</sup>. Kong dan Yu (2007), menyatakan wilayah serapan amida II, yaitu pada kisaran 1480 cm<sup>-1</sup> – 1575 cm<sup>-1</sup>. Adanya gugus Amida II menunjukkan adanya gugus CN *stretching* dan NH *bending*. Hasil tersebut menandakan bahwa semua perlakuan sudah termasuk dalam kisaran standar serapan yang berarti amida II terdeteksi pada bilangan gelombang masing-masing perlakuan.

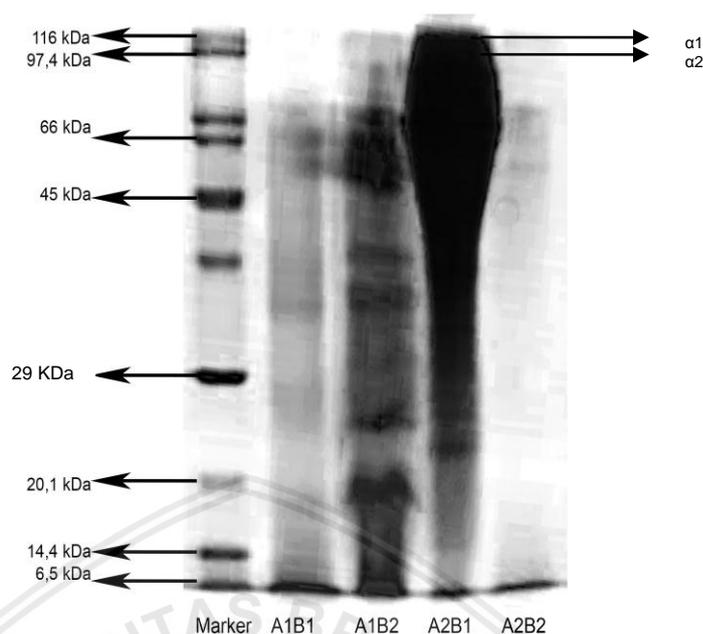
Pada Ikatan amida III bilangan gelombang yang terdeteksi pada kolagen dari kulit ikan bader (*Barbonymus gonionotus*) perlakuan A<sub>1</sub>B<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>B<sub>1</sub>, A<sub>1</sub>B<sub>2</sub> dan A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> yaitu 1240.14, 1259,43, 1244.00 dan 1245.93 cm<sup>-1</sup>. Kong dan Yu (2007), menyatakan Amida III memiliki wilayah serapan 1229 cm<sup>-1</sup> – 1301 cm<sup>-1</sup>. Wilayah serapan pada hasil tersebut mengindikasikan adanya gugus fungsi amida III yang menunjukkan CH *stretching* dan NH *bending*. Muyonga, *et al.* (2004) menyatakan bahwa intensitas amida III berkaitan dengan adanya struktur *triple helix*. Hal ini berarti bahwa senyawa molekul yang dihasilkan dari proses ekstraksi merupakan kolagen dan belum terdegradasi menjadi bentuk gelatin yang ditandai dengan masih adanya struktur *triple helix*.

Menurut Chen, *et al.* (2016), Spektra FTIR menunjukkan puncak karakteristik kolagen kulit ikan nila (*Oreochromis niloticus*) yaitu Amida A dan B, serta Amida I, II, III. Pita amida A kolagen kulit ikan nila ditemukan pada gelombang 3321.55 cm<sup>-1</sup>, dan terkait dengan getaran *stretching* N-H. Getaran *stretching* N-H terjadi pada kisaran 3400-3440 cm<sup>-1</sup>, dan ketika kelompok NH

peptida terlibat dalam ikatan hidrogen, posisi digeser ke frekuensi yang lebih rendah (Doyle, *et al.* 1975). Pita amida B ditemukan di bilangan gelombang  $2924,26\text{ cm}^{-1}$ , dan terkait dengan bentangan  $\text{CH}_2$  asimetris. Pita amida I, II, dan III ditemukan pada  $1652,22$ ,  $1554,92$ , dan  $12442,3\text{ cm}^{-1}$ . Pita amida I, II, dan III diketahui bertanggung jawab atas tingkat tatanan molekul yang ditemukan dalam kolagen, dan terlibat dalam pembentukan struktur heliks rangkap tiga, yang dihasilkan dari *stretching*  $\text{C} = \text{O}$ , dan, serta *Bending*  $\text{NH}$  dan *stretching*  $\text{CH}$ .

#### 4.3 Berat Molekul (SDS-PAGE) Kolagen

Metode yang digunakan untuk mengetahui berat molekul kolagen dari masing-masing ekstrak dilakukan SDS-PAGE. Konsentrasi gel pemisah yang digunakan adalah 7.5% dan gel penahan 4%. SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) merupakan suatu teknik pemisahan protein berdasarkan berat molekulnya. Pada analisis SDS-PAGE, semua protein dibuat bermuatan negatif. SDS yang ditambahkan menyebabkan protein terdenaturasi dan akan berikatan dengan molekul protein sehingga mencegah terjadinya interaksi protein dan protein. Selama proses elektroforesis, kompleks SDS-protein akan bergerak menuju kutub positif. Matriks berpori pada gel poliakrilamid kemudian memisahkan kompleks SDS-protein berdasarkan berat molekulnya (Rehm, 2006). Berat molekul protein dapat ditentukan dengan menggunakan protein baku yang telah diketahui berat molekulnya dan membandingkan dengan nilai mobilitas relatif ( $R_f$ ) yang diperoleh (Suhartono, 1989). Hasil analisis SDS-PAGE kolagen kulit ikan bader dapat dilihat pada Gambar 6.



**Gambar 6.** Pita protein kolagen dari kulit ikan bader

Keterangan:

A<sub>1</sub>B<sub>1</sub> : Rasio kulit dengan asam asetat 1:10 lama waktu ekstraksi 24 jam

A<sub>1</sub>B<sub>2</sub> : Rasio kulit dengan asam asetat 1:10 lama waktu ekstraksi 36 jam

A<sub>2</sub>B<sub>1</sub> : Rasio kulit dengan asam asetat 1:20 lama waktu ekstraksi 24 jam

A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> : Rasio kulit dengan asam asetat 1:20 lama waktu ekstraksi 36 jam

Berdasarkan hasil SDS-PAGE pada gambar 6, menunjukkan kolagen dari kulit ikan bader memiliki nilai bervariasi dari tiap perlakuan. Pada perlakuan A<sub>1</sub>B<sub>1</sub> didapatkan nilai berat molekul sebesar 10,99 – 108,72 kDa, perlakuan A<sub>1</sub>B<sub>2</sub> didapatkan nilai berat molekul sebesar 11,26 – 107,15 kDa, dan pada perlakuan A<sub>2</sub>B<sub>1</sub> didapatkan nilai berat molekul sebesar 12,97 – 106,27 kDa, serta pada perlakuan A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> didapatkan nilai berat molekul sebesar 10,92 – 107,82 kDa. Berat molekul kolagen ikan bader memiliki struktur  $\alpha$ -1 dan  $\alpha$ -2 dengan nilai berkisar antara 99,45 – 108,72 kDa. Hasil tersebut sesuai dengan penelitian Duan, *et al.* (2009), yang menyatakan bahwa kolagen ikan mas (*Cyprinus carpio*) memiliki struktur  $\alpha$ -1 dan  $\alpha$ -2 dengan nilai berat molekul berkisar antara 97 kDa sampai 116 kDa.

Kolagen hasil ekstraksi dari kulit ikan bader merupakan kolagen tipe 1 karena terdapat dua struktur  $\alpha$ , yang sering disebut dengan ( $\alpha$ -1) dan ( $\alpha$ -2), Hema, *et al.* (2013), menyatakan bahwa kolagen tipe I mengandung dua struktur  $\alpha$  yang identik, yaitu  $\alpha$ -1 dan  $\alpha$ -2. Kedua struktur  $\alpha$  pada kolagen ikan dapat dipisahkan dengan SDS-PAGE berdasarkan perbedaan afinitasnya terhadap SDS, dimana  $\alpha$ -2 memiliki afinitas yang lebih tinggi terhadap SDS dibandingkan dengan  $\alpha$ -1. Muyonga, *et al.* (2004), menyatakan bahwa kolagen tipe I ditemukan pada kulit, tendon dan tulang.

Struktur  $\alpha$ -1 menunjukkan intensitas pita protein yang lebih tebal dibandingkan dengan  $\alpha$ -2. Perbedaan spesies ikan menyebabkan variasi jumlah kolagen pada jaringan tubuhnya. Variasi jumlah kolagen tersebut mampu merefleksikan *swimming behavior* dan mempengaruhi karakteristik tekstur otot dari setiap jenis ikan (Montero, *et al.* 1990).

Pola SDS-PAGE hasil pengamatan menunjukkan bahwa kolagen kulit ikan bader memiliki rantai  $\alpha$ -1 dan  $\alpha$ -2 yang tidak teramati secara jelas karena masih tampak berhimpitan. Kondisi ini dapat disebabkan komposisi asam amino rantai  $\alpha$ -1 dan  $\alpha$ -2 yang tidak jauh berbeda (bobot molekul relatif sama) (Wang, *et al.* 2008).

#### 4.4 Komposisi Asam Amino Kolagen

Tujuan analisis komposisi asam amino adalah mengetahui jenis dan komposisi asam amino kolagen hasil ekstraksi dari perlakuan rasio berat kulit ikan bader dengan asam asetat dan lama waktu ekstraksi asam asetat 0.5 M dari kulit ikan bader (*Barbonymus gonionotus*) yang ditentukan oleh hidrolisis asam dari kolagen limbah kulit ikan. Hasil dari analisis komposisi asam amino kolagen kulit ikan bader disajikan pada Tabel 5 dibawah ini.

**Tabel 5.** Komposisi asam amino kolagen kulit ikan bader dan kolagen dari beberapa sumber

No	Asam Amino	Kolagen ikan bader (%) <sup>(1)</sup>	Kolagen ikan nila (%) <sup>(2)</sup>	Kolagen ikan <i>bigeye snapper</i> (%) <sup>(3)</sup>	Kolagen komersial kulit sapi (%) <sup>(4)</sup>
1	Serin	5.93	3.5	4.0	4.2
2	Asam glutamat	11.74	7.6	8.6	8.9
3	Fenilalanin	2.94	1.4	1.7	1.4
4	Isoleusin	Nd	0.9	0.6	1.2
5	Valin	2.43	1.9	2.4	2.1
6	Alanin	10.36	13.0	15.1	11.6
7	Arginin	11.03	6.4	6.6	5.3
8	Glisin	24.64	39.0	31.7	37.1
9	Lisin	3.76	2.2	3.4	2.8
10	Asam Aspartat	7.44	4.6	5.6	5.3
11	Leusin	3.34	2.2	2.7	2.8
12	Tirosin	Nd	0.3	0.4	0.5
13	Prolin	12.60	14.0	12.8	14.3
14	Threonin	3.79	2.4	3.2	1.9
15	Histidin	Nd	0.7	1.1	0.5
	Total	100	100	100	100

Sumber: <sup>(1)</sup>(Data primer, 2019), <sup>(2)</sup>(Zeng, 2009), <sup>(3)</sup>(Kittiphattanabawon, *et al.* 2005) dan <sup>(4)</sup>(Zhao and Chi, 2009)

Hasil analisis komposisi asam amino kolagen dari kulit ikan bader dinyatakan sebagai persentase dari total komposisi asam amino yang diujikan. Hasil analisis menunjukkan bahwa komposisi asam amino dengan hasil tertinggi dari kolagen kulit ikan bader adalah glisin dengan persentase 24.64 %, dilanjutkan oleh prolin dengan persentase 12.60 % dari total asam amino kolagen kulit ikan bader. Komposisi asam amino dengan hasil terendah dari kolagen kulit ikan bader adalah histidin dan tirosin dengan persentase masing-masing 0 %.

Menurut Zeng (2009), Menunjukkan hasil analisis komposisi asam amino tertinggi dari kolagen ikan tawar yaitu dari kulit ikan nila (*Oreochromis niloticus*) adalah glisin dengan persentase 35.60 % dilanjutkan oleh prolin dengan persentase 12.80 %. Sementara hasil terendah didapatkan pada tirosin, metionin dan histidin masing-masing 0.3 %, 0,5 % dan 0.6 %.

Hasil analisis komposisi asam amino kolagen kulit ikan laut yaitu ikan kakap besar atau *bigeye snapper (Priacanthus tayenus)* menunjukkan nilai tertinggi terdapat pada glisin dengan persentase 28.6 % dilanjutkan prolin dengan persentase 11.6 %. Hasil terendah diperoleh oleh tirosin dengan persentase 0.4 % dan isoleusin dengan persentase 0.5 % (Kittiphattanabawon, *et al.* 2005).

Tamilmozhi, *et al.* (2013) menyatakan bahwa prolin merupakan asam amino yang unik pada kolagen karena berperan dalam menjaga integritas struktural kolagen. glisin merupakan asam amino utama pembentuk kolagen yang meliputi 30% dari total asam amino (Kittiphattanabawon, *et al.* 2005).

Kolagen dari kulit memiliki derajat hidroksilasi prolin 39,9%. Oksidasi prolin menjadi residu terhidroksilasi dikatalisis oleh hidroksilasi prolin (Burghagen, 1999). Prolin terhidroksilasi berperan dalam menstabilkan *triple helix*, sehingga membuat ikatan yang kompleks dan tidak mudah terhidrolisis (Ramachandran, 1988).

Hasil analisis tersebut menunjukkan bahwa dapat menggambarkan ekstrak protein yang dihasilkan dari kulit ikan bader (*Barbonymus gonionotus*) sudah termasuk dalam kolagen karena memiliki komposisi asam amino glisin, prolin dan alanin dalam jumlah yang tinggi. Semakin tinggi proses hidroksilasi semakin tinggi komposisi asam amino karena proses tersebut memiliki peran penting dalam menstabilkan struktur protein.

## 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang didapatkan pada penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Hasil penelitian rendemen kolagen kulit ikan bader (*Barbonymus gonionotus*) menunjukkan rasio 1:20 (b/v) dan lama waktu ekstraksi 36 jam mempunyai nilai rendemen yang lebih tinggi yaitu 52,54 %, dibandingkan dengan rasio 1:10 (b/v) dengan lama waktu ekstraksi 24 jam dengan nilai 42,17 %.
2. Karakteristik kolagen dari kulit ikan bader meliputi komposisi asam amino, FTIR dan SDS-PAGE. komposisi asam amino yang dominan terdapat pada kolagen adalah glisin 26,64%, prolin 12,60%, asam glutamat 11,74%, arginin 11,03% dan alanin 10,36%. Analisis FTIR menunjukkan adanya gugus amida A (3423.41 - 3427.27), amida B (2925.81 - 2927.74), amida I (1647.10 - 1650.95), amida II (1544.88 - 1550.66) dan amida III (1240.14 - 1259,43). Hasil SDS-PAGE menunjukkan kolagen hasil ekstraksi dari kulit ikan bader merupakan kolagen tipe 1 karena terdapat dua struktur  $\alpha$ , yang sering disebut dengan ( $\alpha$ -1) dan ( $\alpha$ -2). Dengan berat molekul berkisar antara 99,45 – 108,72 kDa. berdasarkan karakteristik tersebut, hasil ekstraksi kulit ikan bader memenuhi syarat sebagai kolagen.

### 5.2 Saran

Saran dari penelitian ini, sebaiknya di lakukan riset lanjutan tentang karakteristik kolagen dari kulit jenis ikan tawar lainnya dengan metode ekstraksi enzimatik, supaya mengetahui perbandingan karakteristik kolagen dari ekstraksi ASC dan PSC.

## DAFTAR PUSTAKA

- [AOAC] Association of Official Analytical Chemist. 1995. Official method of analysis of the association of official analytical of chemist. Arlington (US) : The Association of Official Analytical Chemist. Inc.
- Alhana., P. Suptijah dan K. Tarman. 2015. Ekstraksi dan karakterisasi kolagen dari daging teripang gamma. *JPHPI*. **18** (2): 150-162.
- Ariyanti, A., M. Dewi., A. P. Hapsari dan S. Mashadi. 2018. Perbandingan kadar kolagen cangkang kerang darah (*Anadara granosa*) dengan cangkang kerang hijau (*Mytilus viridis*) di Bandengan, Kendal, Jawa Tengah. *Jurnal Pharmascience*. **5** (2): 134-142.
- Arumugam. G. K. S., D. Sharma., R. M. Balakrishnan and J. B. P. Ettiyappan. 2018. Extraction, optimization and characterization of collagen from sole fish skin. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*. **9** (2018): 19–26.
- Chai HJ, Li JH, Huang HN, Li TL, Chan YL, Shiau CY, Wu CJ. 2010. Effects of size and conformations of fish-scale collagen peptides on facial skin qualities and transdermal penetration efficiency. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*.(2010):1-9.
- Chen, J., L. Li., R. Yi., N. Xu., R. Gao., and B. Hong. 2016. Extraction and characterization of acid-soluble collagen from scales and skin of tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Food Science and Technology*. **66**: (2016) 453-459.
- Chi CF, Wang B, Li ZR, Luo HY, Ding GF, Wu CW. 2014. Characterization of acid soluble collagen from the skin of hammerhead shark (*Sphyrna lewini*). *J Food Biochem*. **38**:236-247.
- Duan, R., J. Zhang., X. Du., X. Yao., and K. Konno. 2009. Properties of collagen from skin, scale and bone of carp (*Cyprinus carpio*). *Food Chemistry*. **112**:702–706.
- Friess, W. (1998). Collagen–biomaterial for drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm*, **45**, 113-136.
- Gomez-Guillen, MC., Gimenez, B., Lopez-Caballero, ME., Montero MP. 2011. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources. *The Journal of Food Hydrocolloids*. **25**: 1813-1827.
- Hema GS, Shyni K, Mathew S, Anandan R, Ninan G. 2013. A simple method for isolation of fish skin collagen-biochemical characterization of skin collgagen extracted from Albacore Tuna (*Thunnus Alalunga*), Dog Shark (*Scoliodon Sorrakowah*), and Rohu (*Labeo Rohita*). *Annals of Biol Res*. **4**(1): 271-278.

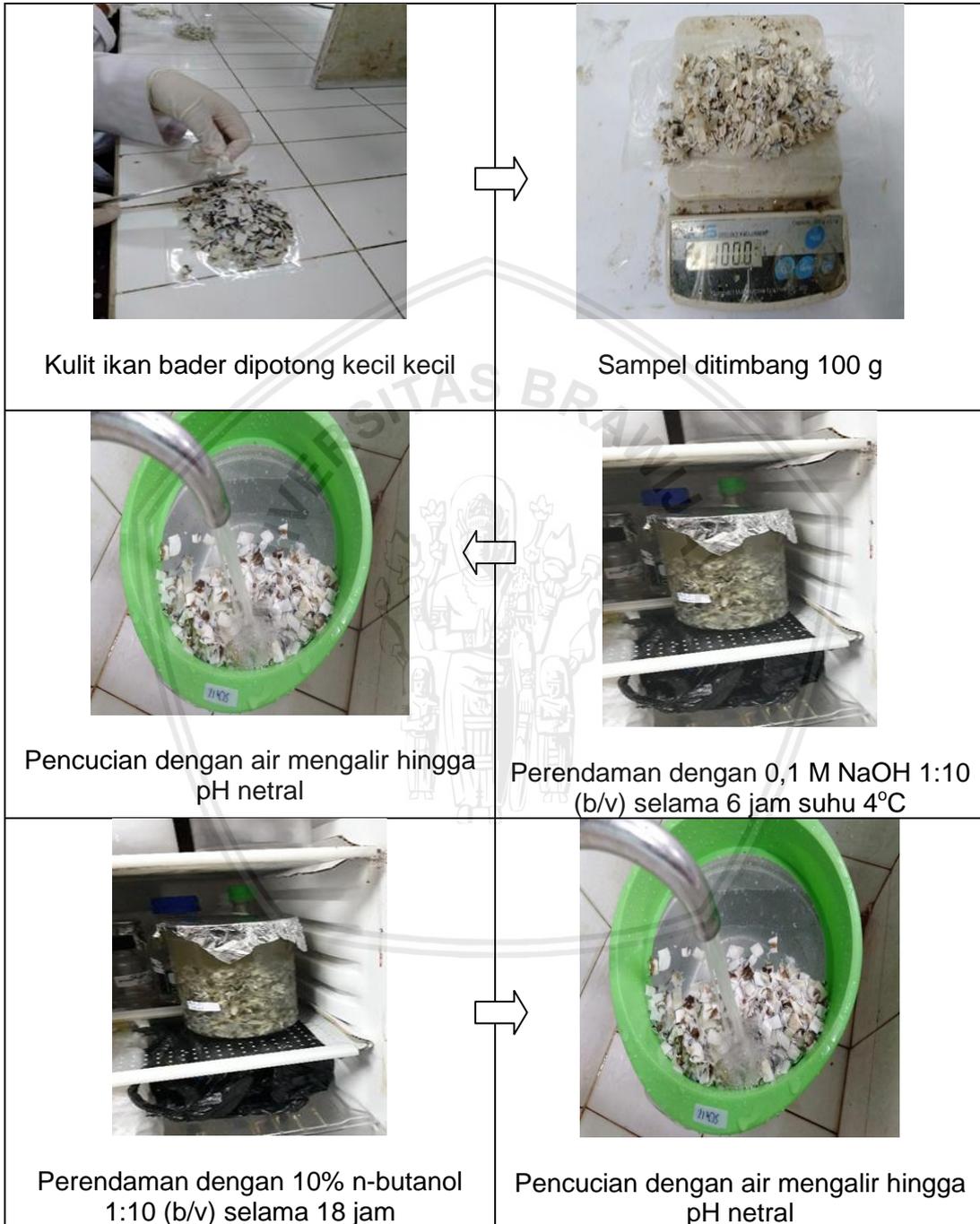
- Herawati, T., A. Yustiati dan A. Nurhayati. 2015. Kandungan Merkuri Pada Daging Ikan Tawes (*Barbonymus gonionotus*) yang Diberi Pakan Eceng Gondok (*Eichornia crassipes*) Dalam Sistem Budidaya Ikan di Waduk Cirata. FPIK. Universitas Padjajaran. 14 hlm.
- I. Hartati dan L. Kurniasari. 2010. Kajian produksi kolagen dari limbah sisik ikan secara ekstraksi enzimatis. *Momentum*. **6** (1) : 33 – 35.
- Jaswir I, Monsur HA, Salleh HM. 2011. Nano-structural analysis of fish collagen extracts for new process development. *African Journal of Biotechnology* **10**(81):18847-18854.
- Jongjareonrak A, Benjakul S, Visessanguan W, Nagai T, Tanaka M. 2005. Isolation and characterization of acid and pepsin solubilized collagen from the skin of brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*). *Food Chem*. **93**:475-484
- Kadler KE, Clair B, Jordi B, raymond P, Boot H. 2007. Collagen at a glance. *J Cell Sci*. **120**(12):1955-1958.
- Katili, A. S. 2009. Struktur dan fungsi protein kolagen. *Jurnal pelangi ilmu*. **2** (5): 19-29.
- Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Nagai, T dan Tanaka, M., 2005, Characterisation of Acid-Soluble Collagen from Skin and Bone of Bigeye Snapper (*Priacanthus tayenus*). *Food Chemistry*. **89**: 363-372.
- Kong, J., and Yu, S. 2007. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta biochim biophys sin*. **39** (8): 549-559.
- Kottelat, M., J. A. Whitten., N. S. Kartikasari and S. Wirjoatmodjo, 1993. Freshwater Fishes of Western Indonesia and Sulawesi. Dalhousie University. Canada.
- Li, J., M, Wang., Y, Qiao., Y, Tian., J, Liu., S, Qin., and W, Wu. 2018. Extraction and characterization of type I collagen from skin of tilapia (*Oreochromis niloticus*) and its potential application in biomedical scaffold material for tissue engineering. *Process Biochemistry*. **18**: 1-27.
- Liu Q, Kong B, Xiong YL, Xia X. 2010. Antioxidant activity and functional properties of porcine plasma protein hydrolysate as influenced by the degree of hydrolysis. *Food Chemistry*. **118**(2): 403–410.
- Martianingsih N, Atmaja L. 2009. Analisis sifat kimia, fisik, dan termal gelatin dari ekstraksi kulit Ikan pari (*himantura gerrardi*) melalui variasi jenis larutan asam. Prosiding KIMIA FMIPA – ITS.
- Muralidharan, N., R. J. Shakila., D. Sukumar and 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*.

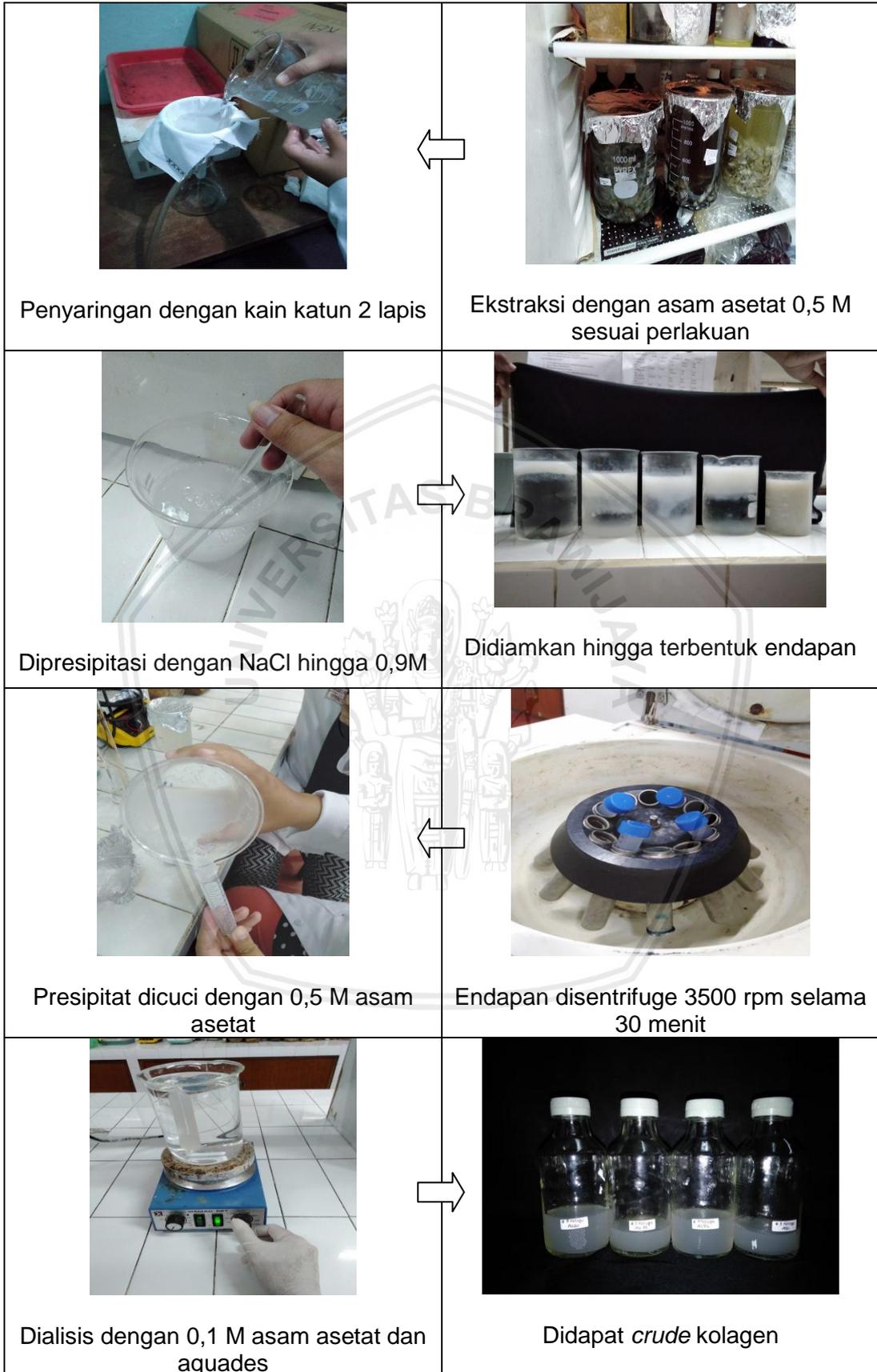
- Muyonga, J.H., Cole, C.G.B., and Duodu, K.G. 2004. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). *Food Chem.* **86**, 325-332.
- N. S. Sukmadinata. 2008. Metode Penelitian Pendidikan. Remaja Rosdakarya. Bandung. hlm. 317.
- Nagai, T. and N. Suzuki. 2000. Isolation of collagen from fish waste material - skin, bone and fins. *Food Chemistry.* **68** (2000): 277-281.
- Nalinanon, S., Benjakul, S., Kishimura, H., and Osako, K. (2011). Type I collagen from the skin of ornate threadfin bream (*Nemipterus hexodon*): Characteristics and effect of pepsin hydrolysis. *Food Chem.* **125**, 500-507.
- Nelson, S joseph. 2006. Fishes of the World. Wiley. Canada.
- Noitup, P., W. Garnjanagoonchorn and M.T.Morrissey. 2005. Fish skin type I Collagen characteristic comparison of albacore tuna (*Thunnus alalunga*) and silver-line grunt (*Pomadasy kaakan*). *J. Aquat. Food Prod. Technol.* **14**(1): 17-27.
- Nurhayati dan R. peranganing. 2009. Prospek pemanfaatan limbah perikanan sebagai sumber kolagen. *Squalen.* **4** (3): 83-92.
- Nurhayati, Tazwir, dan Murniyati. 2013. Ekstraksi dan Karakterisasi Kolagen Larut Asam dari Kulit Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*). *JPB Kelautan dan Perikanan.* **8** (1): 85-92.
- Ogawa, M., Portier, R. J., Moody, M.W., Bell, J., Schexnayder, M.A., and Losso, J.N. 2004. Biomchemical properties of bone and scale collagens isolated from the subtropical fish black brum (*Pogonia cromis*) and sheepshead seabream (*Archosargus probatocephalus*). *Food Chemistry.* **88**: 495-501.
- Potaros, T., Raksakulthai, N., Runglerdkreangkrai, J., and worawattanamatekul, W. (2009). Characteristics of collagen from nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin isolated by two different methods. *Kasetsart Journal.* **43**, 584-593.
- Rehm H. 2006. Protein biochemistry and proteomics. Elsevier: Academic press.
- Sadowska, M., Koladziejaka, I., & Niecikowska, C. 2003. Isolation of collagen from the skins of Baltic cod (*Gadus morhua*). *Food Chemistry.* **81**: 257-262.
- Sahubawa, L dan A. B. Naro putra. 2011. Pengaruh konsentrasi asam asetat dan waktu ekstraksi terhadap mutu kolagen limbah kulit ikan nila hitam. *Jurnal teknoains.* **1** (1): 16-25.

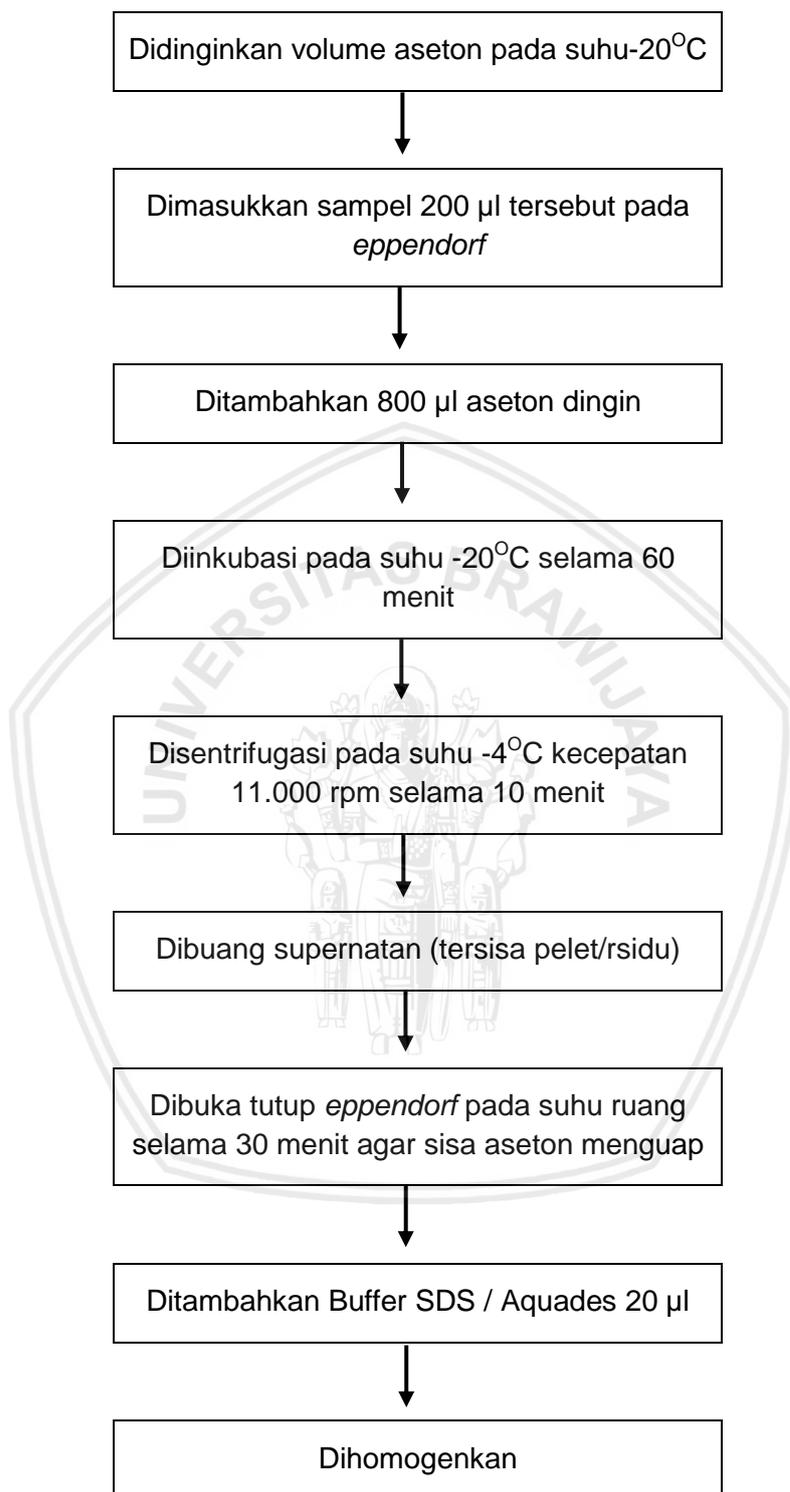
- Setyowati, H dan W. setyani. 2015. Potensi nanokolagen limbah sisik ikan sebagai *cosmoceutical*. *Jurnal farmasi sains dan komunitas*. **12** (1): 30-40.
- Singh, P., S. Benjakul., S. Maqsood and H. Kishimura. 2011. Isolation and characterisation of collagen extracted from the skin of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Food Chemistry* **124** (2011) : 97–105.
- Siyoto, S., dan M. A. Sodik. 2015. Dasar Metodologi Penelitian. Yogyakarta: Literasi Media Publishing. ISBN 978-602-1018-18-7.
- Suhartono MT. 1989. Enzim dan Bioteknologi. Bogor: Pusat Antar Universitas Bioteknologi: IPB
- Tamilmozhi S., Veeruraj A., and Arumugam M. 2013. Isolation and characterization of acid and pepsin-solubilized collagen from the skin of sailfish (*Istiophorus platypterus*). *Food Research International*. **54**: 1499-1505.
- Veeruraj, A., M. Arumugam and T. Balasubramanian. 2013. Isolation and characterization of thermostable collagen from the marine eel-fish (*Evenchelys macrura*). *Process Biochemistry*. **2** (11): 1-11.
- Wang, L., X. An, F. Yang, Z. Xin, L. Zhao, Q. Hu. 2008. Isolation and characterization of collagens from leather, scale and bone of deep-sea redfish (*Sebastes mentella*). *Food Chemistry*. **108**: 616-623.
- Winarno FG. 2008. Kimia Pangan dan Gizi. Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama.
- Wong DWS. 1989. Mechanism and Theory in Food Chemistry. New York: Van Nostrand Reinhold.
- Yamaguchi, K. 2002. Bovine spongiform encephalopathy and people. Iwanami press. Tokyo.
- Yusuf, M. 2014. Metode Penelitian Kuantitatif, Kualitatif, dan Penelitian Gabungan. Jakarta: PT Fajar Interpretama Mandiri.
- Zeng, S. K., C. H Zhang., H. Lin., P. Yang., P. Z Hong., and Z. Jiang. 2009. Isolation and characterisation of acid-solubilised collagen from the skin of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Food Chemistry*. 116: 879–883.
- Zhao, Y H., and Y. J Chi. 2009. Characterization of collagen from eggshell membrane. *Biotechnology*. 8(2) : 254-258.

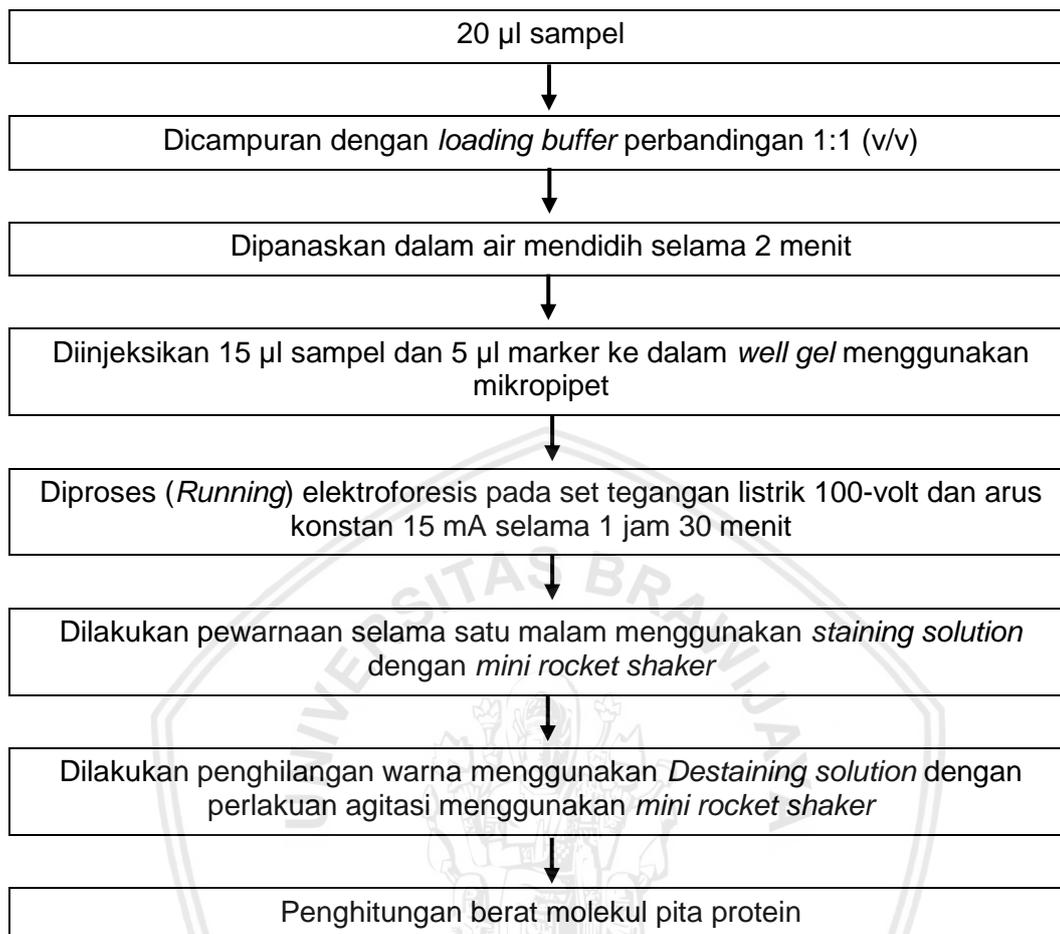
LAMPIRAN

Lampiran 1. Ekstraksi kolagen





**Lampiran 2. Diagram alir preparasi sampel SDS-PAGE**

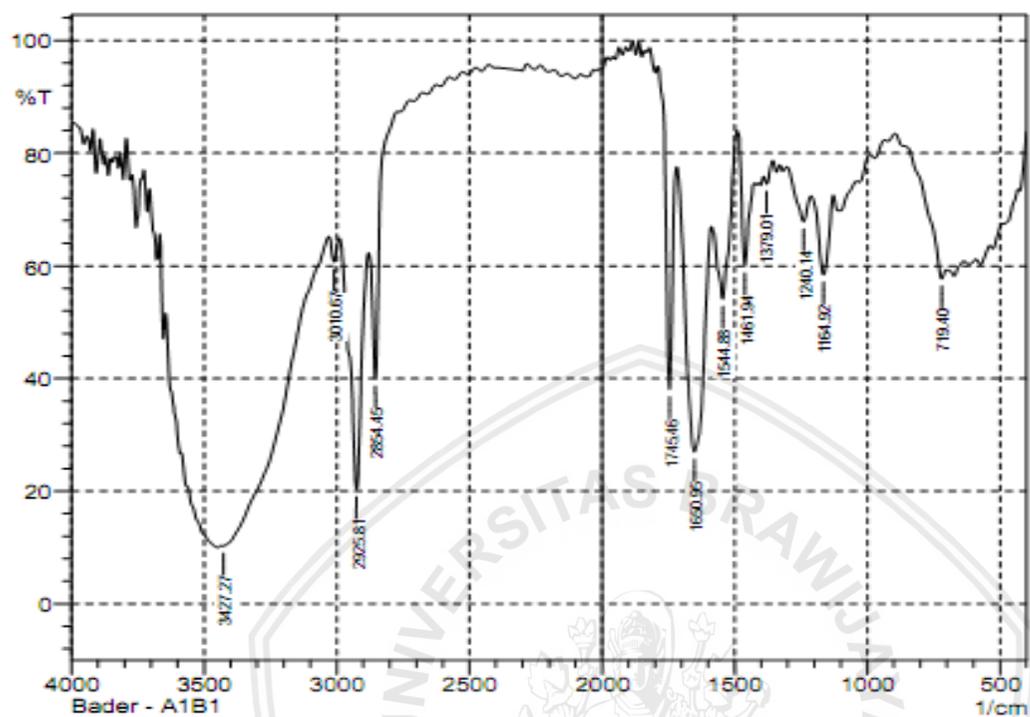
**Lampiran 3. Diagram alir pengujian SDS-PAGE**

**Lampiran 4. Data rendemen**

Perlakuan			Ulangan			Rata-rata	Stdev
Rasio	Lama Waktu	Label	1	2	3		
1:10	24	A1B1	40.54	42.36	43.61	42.17	1.54
	36	A1B2	47.23	49.17	48.89	48.43	1.05
1:20	24	A2B1	49.34	50.32	51.64	50.43	1.15
	36	A2B2	51.72	52.05	53.86	52.54	1.15



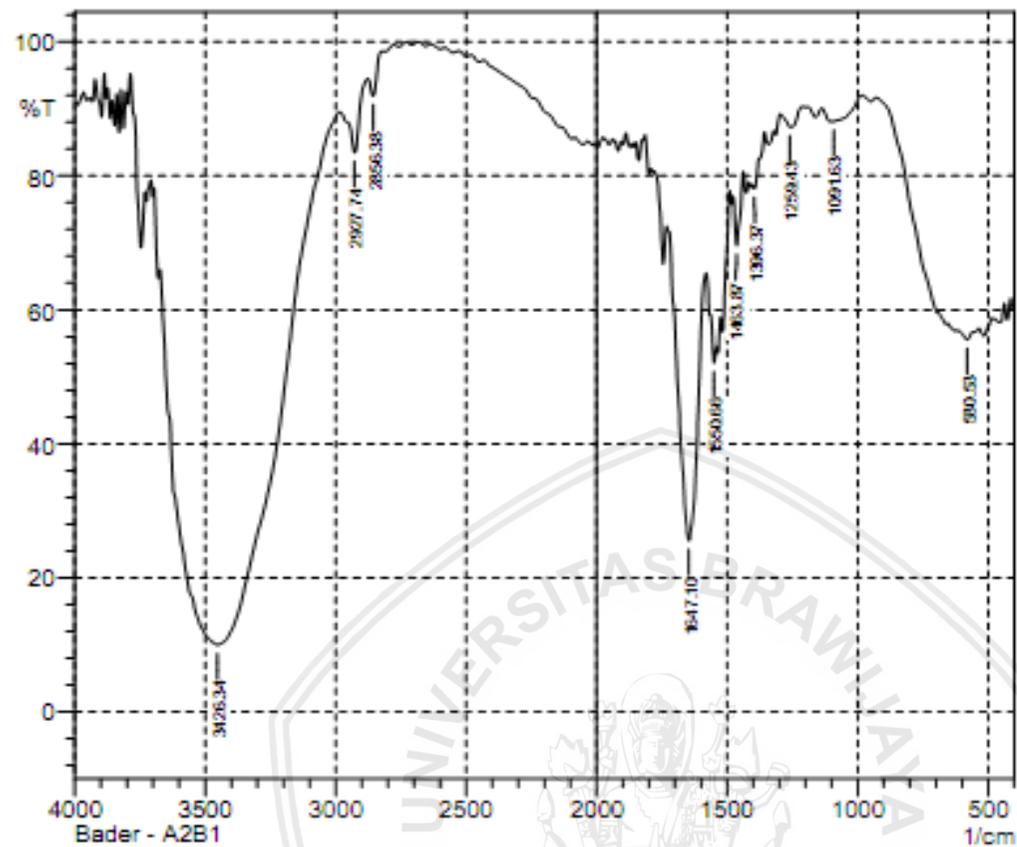
Lampiran 5. Data Pengujian FTIR



Comment:  
Bader - A1B1

Date/Time: 4/29/2019 8:40:49 AM  
No. of Scans: 10  
Resolution: 4.0  
User: Kimia FMIPA-UB

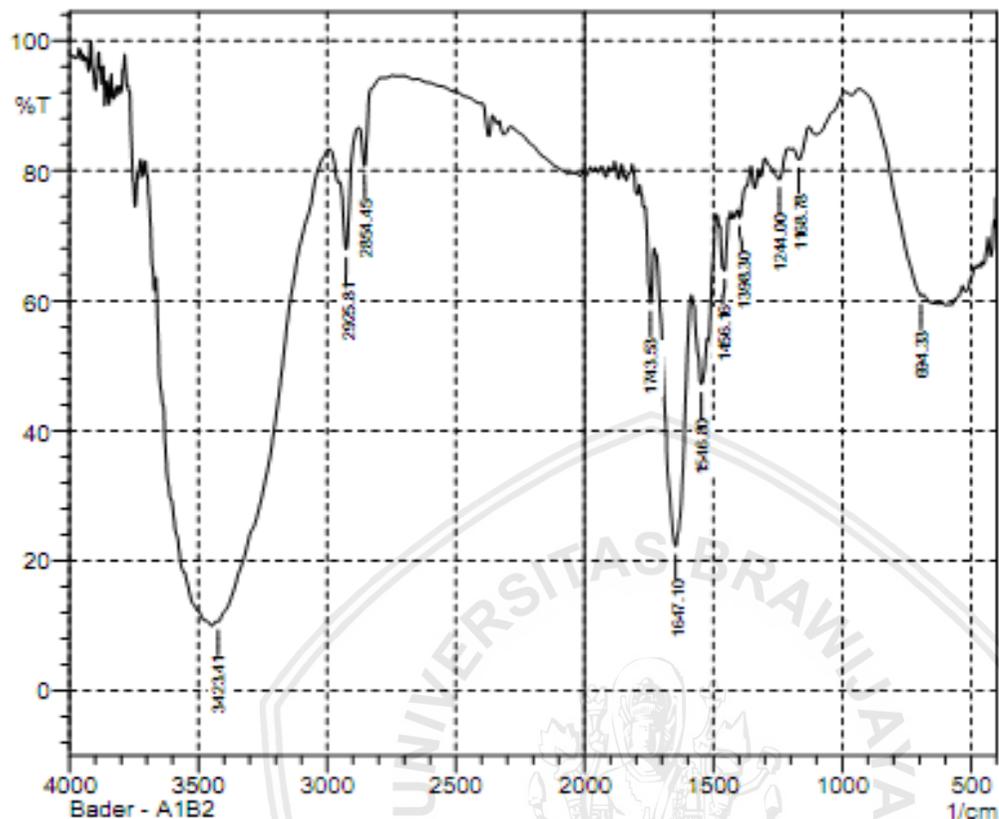
Peak	Intensity	Corr. Inte	Base (H)	Base (L)	Area	Corr. Ara	
1	719.4	67.677	3.772	894.91	702.04	27.48	0.541
2	1164.92	68.379	14.104	1213.14	1128.28	16.56	3.693
3	1240.14	67.837	8.096	1303.79	1213.14	12.965	1.607
4	1379.01	74.49	2.341	1390.58	1355.86	4.099	0.213
5	1461.94	69.998	19.96	1490.87	1425.3	9.893	3.269
6	1544.88	64.087	20.428	1587.31	1490.87	18.348	6.331
7	1660.96	26.944	46.036	1716.53	1589.23	46.658	27.395
8	1745.46	38.054	46.287	1789.82	1718.46	12.165	7.51
9	2854.45	39.929	28.174	2879.52	2771.52	17.132	2.861
10	2925.81	20.269	43.079	2988.46	2881.45	40.352	19.077
11	3010.67	60.674	4.402	3029.96	2991.39	7.756	0.559
12	3427.27	10.269	0.841	3433.06	3031.89	219.287	1.6



Peak	Intensity	Corr. Inte	Base (H)	Base (L)	Area	Corr. Ara	
1	580.53	55.539	1.535	615.25	536.17	19.665	0.419
2	1091.63	88.131	0.279	1099.35	981.7	5.694	0.353
3	1259.43	87.285	2.417	1295.08	1211.21	4.51	0.534
4	1396.37	78.088	1.708	1404.08	1377.08	2.672	0.148
5	1463.87	69.555	8.713	1477.37	1438.8	5.042	1.049
6	1550.66	52.056	4.438	1564.18	1541.02	6.048	0.371
7	1647.1	25.567	42.778	1720.39	1581.52	51.483	28.583
8	2856.38	91.923	4.192	2877.6	2823.59	1.264	0.435
9	2927.74	83.445	8.705	2983.87	2877.6	5.511	1.68
10	3426.34	10	63.502	3672.21	2983.87	350.802	272.223

Comment;  
Bader - A2B1

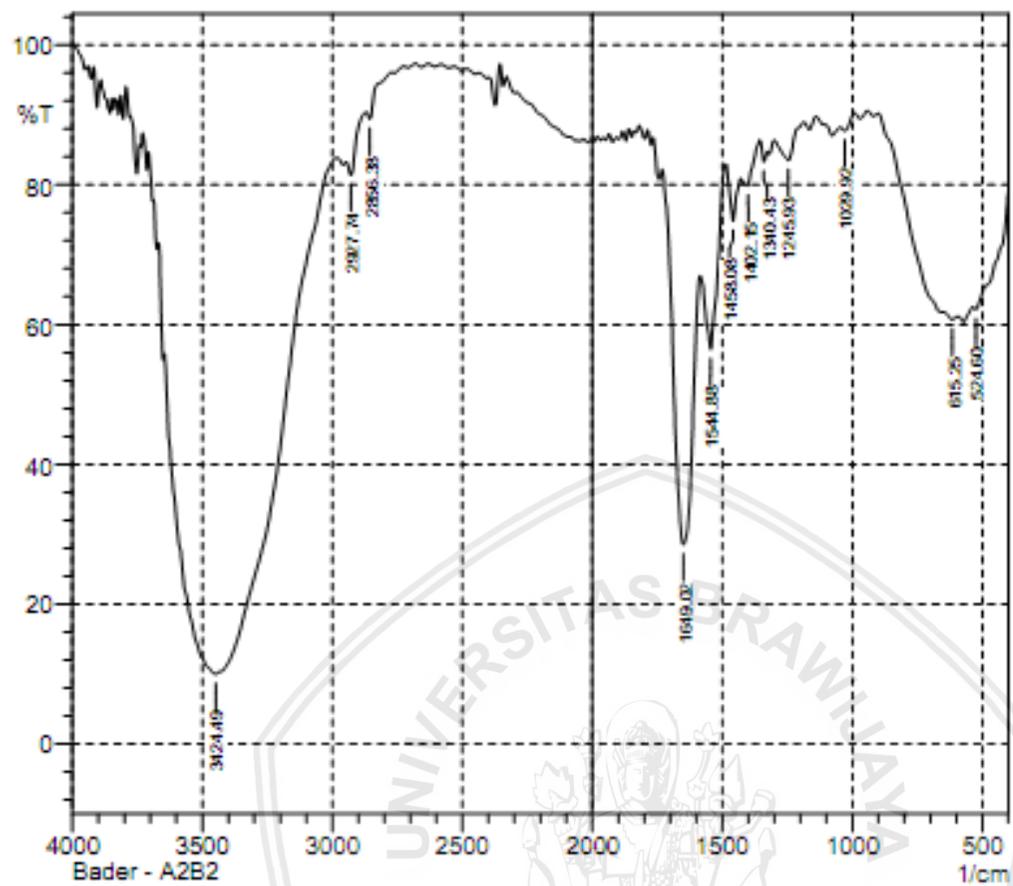
Date/Time: 4/29/2019 9:31:53 AM  
No. of Scans: 10  
Resolution: 4.0  
User: Kimia FMIPA-UB



	Peak	Intensity	Corr. Ints	Base (H)	Base (L)	Area	Corr. Area
1	694.33	60.737	1.522	931.55	684.68	28.33	0.625
2	1168.78	81.702	2.908	1190	1130.21	4.683	0.489
3	1244	78.67	4.262	1299.93	1211.21	8.342	1.033
4	1398.3	72.742	1.878	1404.08	1371.29	4.042	0.099
5	1456.16	64.589	1.337	1458.08	1442.88	2.588	0.078
6	1546.8	47.127	9.445	1575.73	1523.66	15.131	2.338
7	1647.1	22.213	41.31	1720.39	1587.31	56.48	30.435
8	1743.53	59.618	10.859	1766.87	1730.03	6.7	1.308
9	2854.45	80.735	7.816	2875.87	2790.8	4.194	0.471
10	2925.81	67.884	13.343	2952.81	2875.87	8.362	1.853
11	3423.41	10.617	0.687	3427.27	2991.39	190.268	0.199

Comment:  
Bader - A1B2

Date/Time: 4/29/2019 9:55:18 AM  
No. of Scans: 10  
Resolution: 4.0  
User: Kimia FMIPA-UB



Peak	Intensity	Corr. Ints	Base (H)	Base (L)	Area	Corr. Are
1	524.6	52.135	1.841	535.17	399.24	23.237
2	615.25	60.718	0.68	645.11	594.03	11.134
3	1029.92	87.714	1.184	1047.27	991.34	2.929
4	1245.93	83.505	4.128	1299.93	1186.14	7.498
5	1340.43	83.275	2.225	1355.86	1326.93	2.109
6	1402.15	79.851	1.612	1413.72	1355.86	4.767
7	1458.08	74.802	7.188	1485.09	1429.15	5.853
8	1544.88	55.453	16.984	1585.38	1485.09	17.778
9	1649.02	28.512	44.98	1730.03	1587.31	46.582
10	2856.36	89.396	1.816	2869.88	2773.45	2.814
11	2927.74	81.352	3.704	2947.03	2869.88	5.049
12	3424.49	10	54.137	3545.21	2981.74	350.819

Comment;  
Bader - A2B2

Date/Time: 4/29/2019 8:50:28 AM  
No. of Scans: 10  
Resolution: 4.0  
User: Kimia FMIPA-UB

Lampiran 6. Data Hasil Pengujian Asam Amino



**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 : 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 (Bader)  
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.2019.042433

No.	Parameter	Unit	Result	Limit of Detection	Method
1	L-Serin	mg / kg	298.01	-	18-5-17/MU/SMM-SIG, UPLC
2	L-Asam glutamat	mg / kg	589.63	-	18-5-17/MU/SMM-SIG, UPLC
3	L-Fenilalanin	mg / kg	147.87	-	18-5-17/MU/SMM-SIG, UPLC
4	L-Isoleusin	mg / kg	Not detected	3,78	18-5-17/MU/SMM-SIG, UPLC
5	L-Valin	mg / kg	122.21	-	18-5-17/MU/SMM-SIG, UPLC
6	L-Alanin	mg / kg	520.64	-	18-5-17/MU/SMM-SIG, UPLC
7	L-Arginin	mg / kg	553.91	-	18-5-17/MU/SMM-SIG, UPLC
8	Glisin	mg / kg	1237.64	-	18-5-17/MU/SMM-SIG, UPLC
9	L-Lisin	mg / kg	188.69	-	18-5-17/MU/SMM-SIG, UPLC

The results of these tests relate only to the sample(s) submitted. This report shall not be reproduced except in full without the written approval of PT. Saraswanti Indo Genetech

Page 2 of 3





**PT. SARASWANTI INDO GENETECH**

The First Indonesian Molecular Biotechnology Company

GRAHA SIG # 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.2019.042433

No.	Parameter	Unit	Result	Limit of Detection	Method
10	L-Asam Aspartat	mg / kg	373.74	-	18-5-17/MU/SMM-SIG, UPLC
11	L-Leusin	mg / kg	167.57	-	18-5-17/MU/SMM-SIG, UPLC
12	L-Tirosin	mg / kg	Not detected	6.69	18-5-17/MU/SMM-SIG, UPLC
13	L-Prolin	mg / kg	633.07	-	18-5-17/MU/SMM-SIG, UPLC
14	L-Threonin	mg / kg	190.26	-	18-5-17/MU/SMM-SIG, UPLC
15	L-Histidin	mg / kg	Not detected	4.09	18-5-17/MU/SMM-SIG, UPLC

Bogor, 29 Mei 2019  
 PT Saraswanti Indo Genetech

**Dwi Yulianto Laksono, S.Si**  
 Manager Laboratorium

The results of these tests relate only to the sample(s) submitted. This report shall not be reproduced except in full Page 3 of 3 without the written approval of PT. Saraswanti Indo Genetech



**Lampiran 7. Analisis data rendemen dengan SPSS 25.**

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: rendemen

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	180.346 <sup>a</sup>	3	60.115	39.147	.000
Intercept	28103.944	1	28103.944	18301.406	.000
faktor_a	114.886	1	114.886	74.815	.000
faktor_b	52.543	1	52.543	34.216	.000
faktor_a * faktor_b	12.917	1	12.917	8.412	.020
Error	12.285	8	1.536		
Total	28296.575	12			
Corrected Total	192.631	11			

a. R Squared = .936 (Adjusted R Squared = .912)

**Homogeneous Subsets**

**Hasil Rendemen**

Subset for alpha = 0.05

Perlakuan	N	1	2	3
Tukey HSD <sup>a</sup> 1:10 * 24 jam	3	42,1700		
1:10 * 36 jam	3		48,4300	
1:20 * 24 jam	3		50,4333	
1:20 * 36 jam	3			52,5433
Sig.		1,000	,236	1,000