

EKSTRAKSI, KARAKTERISTIK DAN APLIKASI KOLAGEN DARI LIMBAH HASIL PERIKANAN

SKRIPSI

Oleh:

**BAGUS TRIAWAN MIFTAHUL ARIEFIN
NIM. 165080300111003**

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



**PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2020**



EKSTRAKSI, KARAKTERISTIK DAN APLIKASI KOLAGEN DARI LIMBAH HASIL PERIKANAN

SKRIPSI

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

Oleh:

**BAGUS TRIAWAN MIFTAHUL ARIEFIN
NIM. 165080300111003**



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

MALANG

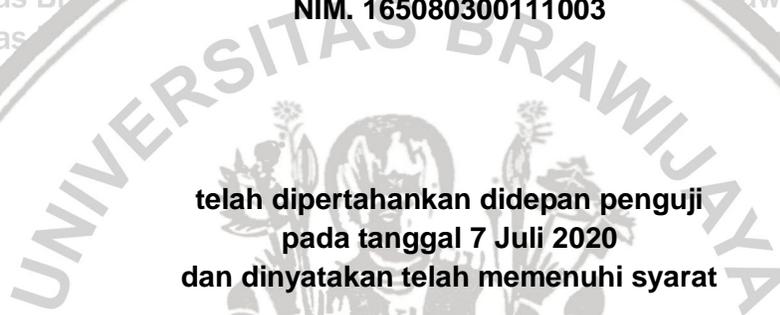
2020

SKRIPSI
EKSTRAKSI, KARAKTERISTIK DAN APLIKASI KOLAGEN DARI LIMBAH HASIL PERIKANAN

Oleh:

BAGUS TRIAWAN MIFTAHUL ARIEFIN
NIM. 165080300111003

telah dipertahankan didepan penguji
pada tanggal 7 Juli 2020
dan dinyatakan telah memenuhi syarat



Mengetahui,
Ketua Jurusan MSP

Dr. Ir. Muhamad Firdaus, MP.

NIP. 19680919 200501 1 001

Tanggal: 7/29/2020

Menyetujui,
Dosen Pembimbing

Asep A Prihanto

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

NIP. 19810602 200604 1 001

Tanggal: 7/28/2020



IDENTITAS TIM PENGUJI

JUDUL : EKSTRAKSI, KARAKTERISTIK DAN APLIKASI KOLAGEN DARI LIMBAH HASIL PERIKANAN

Nama Mahasiswa : BAGUS TRIAWAN MIFTAHUL ARIEFIN

NIM : 165080300111003

Program Studi : Teknologi Hasil Perikanan

PENGUJI PEMBIMBING :

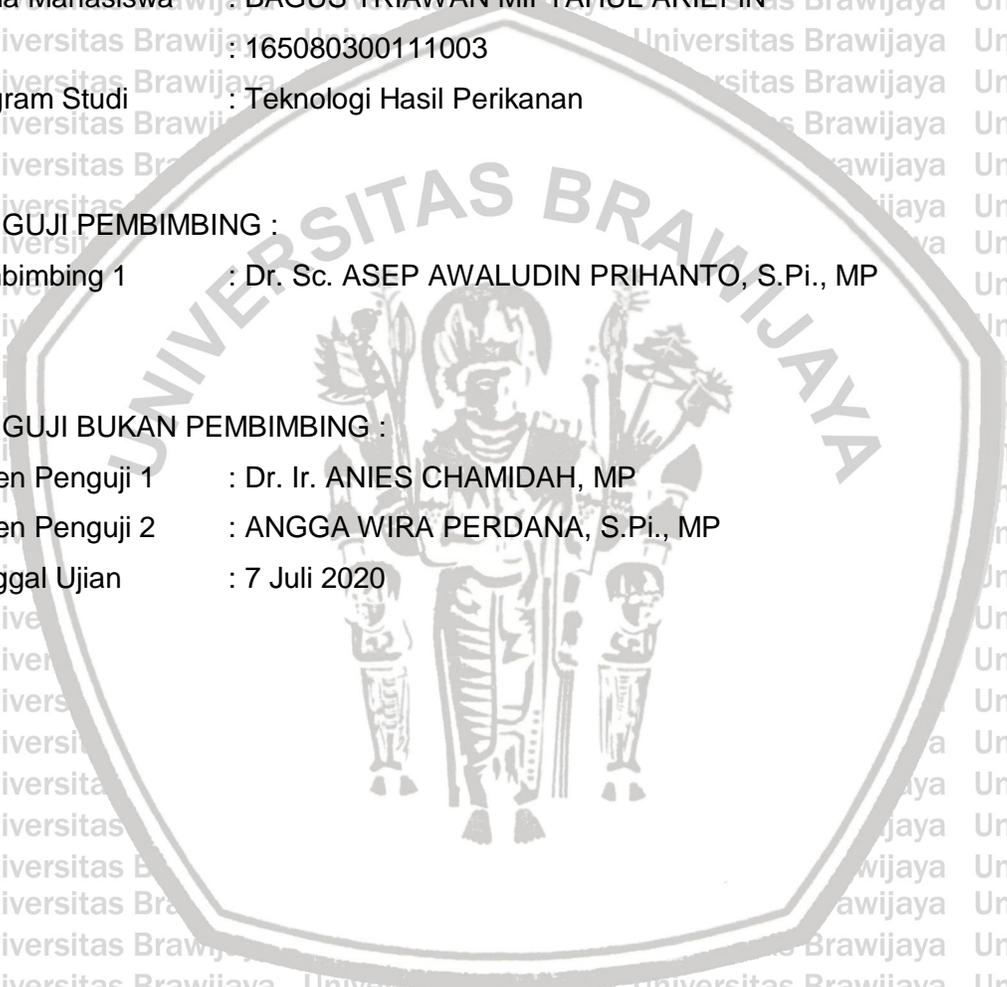
Pembimbing 1 : Dr. Sc. ASEP AWALUDIN PRIHANTO, S.Pi., MP

PENGUJI BUKAN PEMBIMBING :

Dosen Penguji 1 : Dr. Ir. ANIES CHAMIDAH, MP

Dosen Penguji 2 : ANGGA WIRA PERDANA, S.Pi., MP

Tanggal Ujian : 7 Juli 2020



PERNYATAAN ORISINALITAS SKRIPSI

Dengan ini saya menyatakan bahwa 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 jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.



Malang, Juli 2020
Mahasiswa

Bagus Triawan Miftahul Ariefin
NIM. 165080300111003



RINGKASAN

BAGUS TRIAWAN MIFTAHUL ARIEFIN. Ekstraksi, Karakteristik dan Aplikasi Kolagen dari Limbah Hasil Perikanan (dibawah bimbingan **Dr. Sc. Asep Awaludin Prihanto, S.Pi., MP.**)

Kolagen merupakan protein dengan struktur berserat yang merupakan komponen utama matriks ekstraseluler suatu organisme hidup yang berjumlah 25-30% dari total protein dan berperan penting dalam menjaga integritas struktur biologis beberapa jaringan. Kolagen saat ini sudah diklasifikasikan menjadi XXVIII jenis atau tipe yang terbagi menjadi 8 *family*. Sumber yang paling aman untuk produksi kolagen saat ini adalah kolagen hasil laut, hal ini sudah ditetapkan sebagai GRAS (*Generally Recognized as Safe*) oleh FDA. Kolagen hasil laut bisa didapatkan limbah hasil perikanan (tulang, sisik, sirip, kulit, dan gelembung renang) dan hewan invertebrata. Keunggulan kolagen yaitu mudah diserap dalam tubuh, sifat antigenitas yang rendah, afinitas air tinggi, tidak beracun, *biocompatible* dan *biodegradable*. Ekstraksi kolagen dapat dilakukan dengan tiga (3) perlakuan, yaitu *acid soluble collagen* (ASC), *pepsin soluble collagen* (PSC), dan *ultrasound*. Kolagen dari limbah hasil perikanan dapat diterapkan diberbagai macam aplikasi, seperti bidang biomedis, farmasi, kosmetik, dan pangan. Sampai saat ini, berbagai sifat kolagen telah diselidiki lebih lanjut dengan berbagai cara untuk dapat dibuat menjadi beragam aplikasi.

Tujuan dari *review* artikel yaitu untuk membandingkan dan memberikan penjelasan berbagai penelitian tentang kolagen dari limbah hasil perikanan dengan beragam cara perlakuan untuk pengembangan ilmiah dan teknologi, menekankan peluang, dan tantangan yang ada. Sehingga kedepannya dapat dikembangkan menjadi sumber alternatif kolagen.

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis ucapkan kepada Allah SWT atas rahmat dan hidayah-Nya penulis dapat menyusun laporan skripsi *review* artikel yang berjudul **“Ekstraksi, Karakteristik dan Aplikasi Kolagen dari Limbah Hasil Perikanan”**. Laporan skripsi *review* artikel ini disusun sebagai salah satu syarat untuk meraih gelar sarjana di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya Malang. Selain itu, tidak lupa penyusun ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada :

1. Prof. Dr. Ir. Happy Nursyam, MS. selaku Dekan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya Malang.
2. Dr. Sc. Asep Awaludin P, S.Pi., MP. selaku Dosen Pembimbing Skripsi.
3. Kedua orang tua penyusun yang telah memberikan dukungan dan do'a selama ini.

Penulis menyadari bahwa laporan ini masih terdapat kekurangan. Oleh karena itu, penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun sehingga menjadi lebih baik, dari isi maupun cara penulisan. Semoga laporan ini dapat berguna bagi semua pihak dalam upaya meningkatkan fungsi dan proses belajar mengajar di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya Malang.

Malang, 24 Juni 2020

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

COVER	i
HALAMAN JUDUL	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
IDENTITAS TIM PENGUJI	iv
PERNYATAAN ORISINALITAS SKRIPSI	v
UCAPAN TERIMA KASIH	vi
RINGKASAN	vii
KATA PENGANTAR	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Tujuan Penelitian.....	3
2. METODE REVIEW	4
2.1 Metode Pengumpulan Data.....	4
3. HASIL REVIEW	5
3.1 Limbah Hasil Perikanan.....	5
3.1.1 Pengertian.....	5
3.1.2 Tipe Limbah Hasil Perikanan.....	5
3.1.3 Karakteristik Kimia Limbah Hasil Perikanan.....	6
3.1.4 Potensi Limbah Perikanan di Indonesia.....	7
3.2 Kolagen.....	8
3.2.1 Pengertian.....	8
3.2.2 Struktur Kolagen.....	8
3.2.3 Tipe Kolagen.....	10
3.2.4 Sumber Kolagen.....	12
3.2.5 Limbah Perikanan sebagai Sumber Alternatif Kolagen.....	12
3.3 Ekstraksi Kolagen.....	14
3.3.1 Ekstraksi <i>Acid Soluble Collagen</i> (ASC).....	15
3.3.2 Ekstraksi <i>Pepsin Soluble Collagen</i> (PSC).....	26
3.3.3 Ekstraksi Kolagen <i>Ultrasound</i>	37
3.3.4 Faktor yang Mempengaruhi Ekstraksi Kolagen ASC, PSC, dan <i>Ultrasound</i>	42
3.4 Karakteristik Fisiko-Kimia Kolagen.....	49
3.4.1 Komposisi asam amino.....	49
3.4.2 Stabilitas Termal.....	55
3.4.3 Kelarutan Kolagen pada Pengaruh pH dan NaCl.....	58
3.4.4 <i>Zeta Potential</i>	60
3.4.5 Serapan FTIR.....	62
3.4.6 SDS-PAGE.....	64
3.5 Aplikasi Kolagen.....	66
3.5.1 Aplikasi di Bidang Biomedis dan Farmasi.....	66
3.5.2 Aplikasi di Bidang Kosmetik.....	69
3.5.3 Aplikasi di Bidang Pangan.....	69



3.6 Proyeksi Kedepan 70

4. KESIMPULAN 72

DAFTAR PUSTAKA 73



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Komposisi kimia umum limbah perikanan	6
2. Proporsi limbah hasil perikanan	7
3. Tipe kolagen	11
4. Beberapa sumber perikanan yang berpotensi sebagai kolagen	13
5. Metode ekstraksi <i>acid soluble collagen</i> (ASC) dari berbagai sumber	18
6. Metode ekstraksi <i>pepsin soluble collagen</i> (PSC) dari berbagai sumber	28
7. Metode ekstraksi kolagen <i>ultrasound</i> dari berbagai sumber	39
8. Komposisi asam amino kolagen dari berbagai sumber	50
9. Suhu transisi maksimum dari sumber kolagen yang berbeda	56



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Struktur serat kolagen dan penyusun rantai polipeptida.....	9
2. Struktur kolagen <i>triple helix</i>	10
3. <i>Flow chart</i> kolagen larut asam (ASC).....	15
4. <i>Flow chart</i> kolagen larut enzim (PSC).....	26
5. <i>Flow chart</i> metode ekstraksi <i>ultrasound</i>	37



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kolagen berasal dari bahasa Yunani yaitu *kola* yang mempunyai arti “bahan pembentuk perekat”. Kolagen merupakan protein serabut yang memberikan kekuatan dan fleksibilitas pada jaringan dan tulang hal ini sangat penting untuk berbagai jaringan lainnya, termasuk kulit dan tendon. Kolagen adalah protein yang paling melimpah dalam jaringan hewan dengan proporsi 30% dari total protein yang ada dalam tubuh sebagai komponen utama dari jaringan ikat, otot, gusi, dan kulit (Ata *et al.*, 2016). Menurut studi yang dilakukan oleh Nurhayati dan Peranginangin, (2009), kolagen merupakan protein umum dengan struktur ekstraseluler yang terlibat dalam pembentukan jaringan ikat. Hingga kini kolagen terbagi menjadi 28 variasi yang sudah diidentifikasi, yaitu tipe I–XXVIII. Mereka semua bervariasi dalam komposisi asam amino dan strukturnya, selain itu kolagen bersifat *biodegradable* dan protein yang terdapat dalam kolagen terdiri dari 18 jenis asam amino, 7 diantaranya adalah asam amino esensial (Safithri *et al.*, 2019).

Kolagen diketahui mempunyai banyak manfaat pada bidang medis dan farmasi. Pada pemanfaatan kolagen di bidang medis dan farmasi antara lain untuk penanganan penderita hipertensi, permasalahan urinari, sakit yang berkaitan dengan *osteoarthritis*, agen hemostatik, hemodialisis, tulang buatan, pemulihan operasi organ-organ yang rusak, dan rekayasa jaringan untuk implantasi pada manusia (Sahubawa dan Putra, 2011; Putra *et al.*, 2013). Dapat diketahui bahwa potensi kolagen dan peptida yang diterapkan pada industri medis telah mengalami perkembangan. Hal ini juga menemukan aplikasi dalam bidang kosmetik sebagai pelembab, humektan, anti penuaan dan produk anti kerut. Ini juga telah terakreditasi untuk memiliki aplikasi potensial dalam bidang industri makanan (Raman dan Gopakumar, 2018).

Pada saat ini, biasanya kolagen komersial didapatkan secara umum dari kulit dan tulang babi atau kulit dan tulang sapi. Namun, pemanfaatan kolagen yang berasal hewan babi dan sapi dikhawatirkan dapat menimbulkan masalah kesehatan manusia dan masalah kehalalan. Masalah yang sering dihadapi oleh kolagen yang dibuat melalui hewan sapi adalah dapat menyebabkan wabah penyakit seperti *prion bovine spongiform encephalopathy* (BSE), penyakit mulut dan kuku (Safithri *et al.*, 2019), penyakit sapi gila (*mad cow disease*), dan yang berasal dari babi dikhawatirkan mengandung penyakit flu babi (Ata *et al.*, 2016). Permasalahan ini dapat ditangani dengan mengganti bahan baku alternatif kolagen yaitu berasal dari limbah hasil perikanan.

Limbah hasil perikanan merupakan produk samping dari pengolahan ikan. Produk samping ini merupakan hasil dari proses pengolahan ikan dan tergolong masih dapat dimanfaatkan. Limbah ini bisa berupa kepala, kulit, tulang, sisik, dan isi perut. Jumlahnya dapat mencapai 50-70% dari total bahan baku dan dapat mencemari lingkungan apabila tidak disertai dengan sistem pembuangan yang tepat. Produk samping ini biasanya banyak dimanfaatkan sebagai bahan pakan dengan nilai ekonomis rendah. Maka dari itu, untuk memanfaatkan optimal dari produk samping pengolahan ikan menjadi nilai ekonomis tinggi dan mengurangi pencemaran lingkungan. Limbah tersebut dapat sebagai bahan baku kolagen (Pamungkas *et al.*, 2018). Dengan begitu, pemanfaatan limbah kulit, sisik, tulang, dan gelembung renang dapat dijadikan sebagai solusi alternatif untuk bahan baku kolagen (Junianto *et al.*, 2018).

Pemanfaatan kolagen yang diekstrak dari perikanan dapat memberikan keuntungan diantaranya adalah mampu mengatasi kebutuhan sekaligus kontroversi penggunaan kolagen dikalangan keyakinan dan etnis tertentu terhadap bahan baku dari hewan terrestrial, misalnya babi, sapi, dan ayam. Penggunaan bahan baku ikan sebagai kolagen diharapkan dapat menghindari bahaya seperti penyakit yang menyerang pada babi, sapi, dan ayam (Kartika *et al.* 2016), dinilai memiliki nilai biologis yang tinggi, kandungan asam amino esensial yang tinggi, dan kandungan hidroksiprolin yang rendah (Romadhon *et al.*, 2019). Hal lain dari pemanfaatan limbah hasil perikanan tersebut dapat diaplikasikan ke berbagai bidang dengan alasan murah. Selain itu, dengan memanfaatkan limbah diharapkan dapat mengurangi jumlah limbah industri pengolahan dan juga dapat meningkatkan nilai tambah limbah tersebut. Jika dinilai berdasarkan segi kualitas dan kuantitasnya kolagen dari ikan lebih baik dari kolagen mamalia (Junianto *et al.*, 2018).

Dapat dikatakan bahwa produksi kolagen dari limbah hasil perikanan bisa dijadikan sumber alternatif untuk memenuhi kebutuhan kolagen baik dalam skala negeri maupun ekspor. Sehingga, limbah hasil perikanan tidak menjadi lagi hasil sampingan dan dengan mengisolasi kolagen dari limbah perikanan merupakan salah satu cara untuk merubah produk menjadi produk yang bernilai komersial lebih tinggi (Nurhayati dan Peranginangin, 2009).

1.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dari *review* artikel ini adalah sebagai berikut:

1. Untuk mengetahui potensi dari limbah hasil perikanan sebagai sumber alternatif pembuatan kolagen.
2. Untuk memberikan analisis mengenai limbah hasil perikanan yang dapat dijadikan sebagai sumber alternatif pembuatan kolagen



2. METODE REVIEW

2.1 Metode Pengumpulan Data

Pada penulisan *review* artikel ini, metode yang digunakan adalah melalui studi literatur atau tinjauan pustaka. Penulis mereview artikel ini dengan cara menggunakan data kualitatif dari hasil analisis beberapa jurnal referensi terkait topik yang akan dibuat. Studi literatur atau tinjauan pustaka adalah suatu cara untuk mempelajari literatur-literatur dan sumber-sumber lainnya yang berkaitan atau berhubungan dengan topik atau masalah yang diteliti. Selain itu, peneliti mengumpulkan data dengan menggunakan data sekunder. Data sekunder merupakan sumber data tidak langsung memberikan data kepada pengumpul data atau suatu data yang dikumpulkan dengan maksud untuk menyelesaikan masalah yang sedang dihadapi. Data didapatkan dari *search engine* seperti *Google Chrome* yang kemudian menghubungkan pada situs-situs publikasi jurnal seperti *Elsevier, Researchgate, Springer, MDPI, Pub Med, Online Wiley* dan lain sebagainya. Setelah didapatkan berbagai referensi jurnal, kemudian dilakukan penyeleksian jurnal yakni pustaka yang diambil adalah 60% yang diatas tahun 2010.

3. HASIL REVIEW

3.1 Limbah Hasil Perikanan

3.1.1 Pengertian

Pada sektor perikanan selain menghasilkan produk yang dapat dimanfaatkan untuk memenuhi kebutuhan pangan, industri, maupun sumber pendapatan juga menghasilkan limbah (Harianti, 2012). Umumnya proses produksi pengolahan seringkali menghasilkan limbah dalam jumlah yang melimpah. Dapat diartikan bahwa limbah hasil perikanan adalah hasil sisa dari proses pengolahan atau produksi, dimana terdiri dari limbah padat dan limbah cair (Nurhayati dan Peranginangin, 2009). Sekitar 55% hasil proses pabrik industri ditujukan untuk dikonsumsi manusia. Setelah hasil proses yang ditujukan untuk pangan, bagian-bagian sisanya dibuang dengan meninggalkan substansi yang sebenarnya bernilai untuk dieksploitasi (Caldeira *et al.*, 2018).

Sering sekali melihat bahwa limbah perikanan jarang dimanfaatkan dengan baik dan biasanya langsung dibuang sehingga dapat mencemari lingkungan sekitar. Namun, sebenarnya limbah perikanan dapat dimanfaatkan menjadi produk yang bernilai tinggi (Harianti, 2012). Dapat diketahui bahwa limbah perikanan terbilang memiliki kandungan organik yang tinggi, seperti mengandung beberapa fraksi protein, lipid, dan mineral. Untuk pemanfaatannya diperlukan mengolahnya terlebih dahulu sebelum dibuang. Maka dari itu, limbah perikanan dapat ditingkatkan nilai jual ekonominya dan membuat perspektif terhadap limbah berubah. Hal ini dikarenakan dengan memanfaatkannya sisa proses tersebut dapat meminimalisir pencemaran lingkungan. Dengan demikian dapat menjadikan limbah ini penting dan menarik untuk dieksploitasi (Caldeira *et al.*, 2018).

3.1.2 Tipe Limbah Hasil Perikanan

Umumnya, menurut Coppola *et al.* (2020), limbah hasil perikanan dapat dikategorikan dari limbah pengolahan ikan maupun non ikan. Seperti biasa, industri hasil pengolahan ikan biasa menghasilkan limbah, seperti limbah padat dan limbah cair. Limbah padat adalah sesuatu yang tidak terpakai dan berbentuk padatan. Limbah padat hasil perikanan dapat berupa ikan rucah, sisa olahan pabrik, kesalahan dalam penanganan, dan produksi yang berlebihan (Harianti, 2012). Limbah padat biasanya juga berupa kepala, sirip, kulit, tulang, sisik, daging bukan filet, ekor, pencernaan, dan insang. Limbah cair bisa berupa darah, lendir, dan air (Nurhayati dan Peranginangin, 2009; Caldeira *et al.*, 2018). Limbah padat juga bisa

diambil dari non ikan yaitu kerang-kerangan, landak laut, dan hewan perairan lainnya (Ariyanti *et al.*, 2018; Coppola *et al.*, 2020).

Limbah hasil pengolahan ikan seperti limbah padat menurut Ghali *et al.* (2013), yang terdiri dari kepala, ekor, kulit, pencernaan, sirip, dan lain-lain masih dapat dimanfaatkan kembali menjadi produk yang memiliki nilai jual tinggi. Hasil sampingan ini bisa dikonversi menjadi sumber produk yang kaya kandungan protein, asam amino, kolagen, gelatin, minyak, dan enzim. Hal ini juga disampaikan oleh Harianti (2012), bahwa limbah padat bisa dijadikan alternatif produk yang memiliki nilai tambah, seperti tepung ikan, silase, kitin, kitosan, kecap ikan, terasi ikan/udang, dan kerupuk udang.

3.1.3 Karakteristik Kimia Limbah Hasil Perikanan

Industri pengolahan perikanan diketahui selalu menyisakan limbah dalam jumlah besar. Menurut Nurhayati dan Peranginangin (2009), biasanya limbah diperkirakan memiliki proporsi 37,9% dari total bahan baku yang terdiri dari bagian kepala sekitar 12,0%, tulang 11,7%, sirip 3,4%, kulit 4,0%, duri 2,0%, bagian isi perut sekitar 4,8% turut serta di dalamnya terdapat gelembung renang, hati, dan gonad. Untuk limbah padat, besarnya jumlah bergantung pada jenis ikan dan metode preparasinya.

Komposisi kimia limbah hasil perikanan menurut Ghaly *et al.* (2013) dan Caldeira *et al.* (2018), bergantung pada spesies, kelamin, status nutrisi, musim panen, dan kesehatan. Kebanyakan ikan mengandung 15-30% protein, 0-25% lemak, dan 50-80% kadar air. Sebagai contoh, dapat dilihat pada **Tabel 1**. Menunjukkan kisaran komposisi nutrisi umum pada limbah perikanan.

Tabel 1. Komposisi kimia umum limbah perikanan

Nutrisi	Jumlah (%)
Crude protein	57,92
Lemak	19,10
Abu	21,79
Kalsium	5,80
Fosfor	2,04
Potassium	0,68
Sodium	0,61
Magnesium	0,17

(Sumber : Ghaly *et al.*, 2013)

Dari tabel diatas dapat dinyatakan bahwa limbah perikanan masih memiliki komposisi yang terbilang tinggi. Komposisi tersebut dapat dimungkinkan untuk mengeksploitasi limbah ke berbagai produk yang dinilai dapat meningkatkan nilai ekonomi daripada untuk membuang langsung ke lingkungan yang dapat menyebabkan pencemaran.

3.1.4 Potensi Limbah Perikanan di Indonesia

Indonesia merupakan negara dengan kekayaan laut melimpah. Dari data statistik perikanan tangkap yang diperoleh dari tahun 2013-2017 sebesar 6,1-7,0 juta ton (KKP, 2020). Berdasarkan data tersebut maka terjadi peningkatan produksi perikanan tangkap di perairan Indonesia. Peningkatan tersebut dimungkinkan terjadi karena populasi penduduk yang semakin banyak sehingga menyebabkan peningkatan permintaan produk hasil perikanan. Seiring meningkatnya permintaan volume produksi, maka kemungkinan besar juga limbah perikanan kian meningkat. Menurut Nurhayati dan Peranginangin (2009), limbah hasil pengolahan ikan diperkirakan memiliki proporsi sebesar ±37,9% dari total bahan baku ikan yang terdiri dari bagian kepala 12,0%; tulang 11,7%; sirip 3,4%; kulit 4,0%; duri 2,0%; isi perut sekitar 4,8% yang didalamnya terdapat gelembung renang, hati, dan gonad. Proporsi ini dapat dikatakan bergantung pada jenis ikan dan metode preparasinya. Berdasarkan perkiraan tersebut maka diperoleh limbah perikanan Indonesia pada tahun 2017 yang dapat dilihat pada

Tabel 2.

Tabel 2. Proporsi limbah hasil perikanan

Proporsi Limbah	Tahun 2017	
	Jumlah Limbah (± juta ton)	
Kepala	0,84	
Tulang	0,82	
Sirip	0,24	
Kulit	0,28	
Duri	0,14	
Isi Perut	0,34	
Jumlah	2,66	

Berdasarkan potensi yang ada, dapat dinyatakan bahwa limbah perikanan sesungguhnya dapat diolah menjadi produk yang memiliki nilai ekonomis tinggi. Hal ini dikarenakan limbah perikanan masih memiliki komposisi yang tinggi, jika dilihat dari **Tabel 1**. Sesuai dengan Astiana *et al.* (2016), menyatakan bahwa limbah perikanan memiliki komposisi yang didominasi oleh protein. Salah satu pemanfaatan dari limbah perikanan sehingga memiliki nilai ekonomis tinggi adalah kolagen.

Namun, semua limbah yang tersedia selama sisa proses pengolahan, tidak semuanya dapat dijadikan sebagai kolagen. Dari sekian banyaknya limbah hanya beberapa sumber limbah yang dapat dijadikan sebagai kolagen seperti kerangka tulang (kepala, sirip, bagian badan), kulit, sisik, dan gelembung renang. Hal ini juga sesuai dengan pernyataan dari Coppola



et al. (2020), bahwa bagian dari ikan yang dapat dimanfaatkan sebagai kolagen adalah sisik, kulit, tulang, dan gelembung renang.

3.2 Kolagen

3.2.1 Pengertian

Kolagen adalah protein dengan struktur berserat yang merupakan komponen utama matriks ekstraseluler suatu organisme hidup yang berjumlah 25-30% dari total protein dan berperan penting dalam menjaga integritas struktur biologis beberapa jaringan (Romadhon et al., 2019). Berdasarkan Das et al. (2017), kolagen terlibat dalam pembentukan dan mempertahankan fleksibilitas dan kekuatan jaringan, seperti tulang, kulit, sendi, ligamen, otot, kuku, rambut, dan lain-lain. Sampai saat ini, kolagen terbagi ke dalam bentuk genetik yang berbeda-beda yang telah diidentifikasi dari tipe I-XXVIII.

Menurut Raman dan Gopakumar (2018), bahwa potensi kolagen sudah meningkat dan berkembang pada dunia media operasi, ortopedi, optamologi, dan dentis. Hal ini juga sudah diterapkan pada bidang kosmetik dan bidang pangan. Sementara itu, keunggulan kolagen adalah bahwa penggunaan kolagen berkaitan dengan karakteristik fisikokimia, yaitu mudah diserap dalam tubuh, sifat antigenitas yang rendah, afinitas air tinggi, tidak beracun, *biocompatible* dan *biodegradable*, relatif stabil, dapat disiapkan dalam berbagai kebutuhan, dan mudah larut dalam air dan asam (Suptijah et al., 2018). Sebagai tambahan, kolagen adalah salah satu biomaterial yang paling berguna. Hal ini disebabkan kandungan proteinnya yang paling tinggi dan sifat fungsional yang baik, termasuk kapasitas penyerapan air, pembentukan gel, dan kemampuan untuk membentuk dan menstabilkan emulsi yang dapat menyebabkan permintaan tinggi untuk memproduksi kolagen dalam skala industri (Felician et al., 2018).

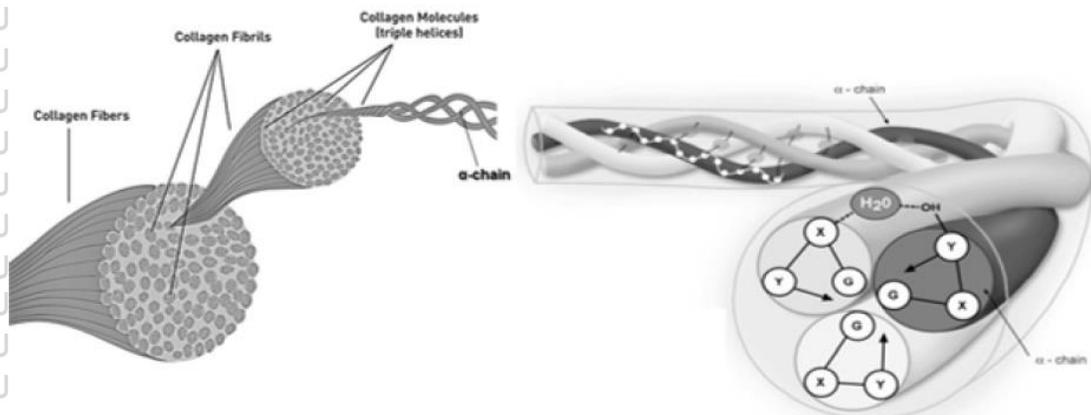
3.2.2 Struktur Kolagen

Kolagen merupakan komponen struktural utama dari jaringan ikat putih (*white connective tissue*) yang ada pada tubuh hewan. Kolagen tersedia pada kulit, tendon, tulang keras, tulang rawan, dan jaringan (Nurhayati dan Peranginangin, 2009). Kolagen mempunyai berat molekul sekitar 300.000 Da dengan diameter 14-15^o A dan panjang sekitar 2800^o A. kolagen dikomposisikan oleh tiga rantai polipeptida (α chains) yang diatur dalam konformasi *triple helix*. Hal ini bisa disebut *tropocollagen* (Felician et al., 2018; Silva et al., 2014).

Secara struktural, kolagen terdiri dari *triple helix* polipeptida yang berukuran hampir sama. Setiap rantai mengandung sekitar 1000 asam amino. Kolagen tersusun dari tiga asam amino utama, diantaranya adalah glisin, prolin, dan alanin. Urutan rantai polipeptida dapat digambarkan sebagai Gly-XY, dimana X dan Y sering ditemukan sebagai prolin dan

hidroksiprolin (Das *et al.*, 2017). Glisin terdapat pada posisi ketiga pada susunan asam amino *triple* heliks kolagen dan menyusun sekiranya hampir 1/3 dari struktur kolagen, sehingga sisanya adalah asam amino yang lain. Asam amino glisin akan mempengaruhi ikatan hidrogen yang berperan dalam pembentukan rantai α *triple* heliks pada kolagen (Safithri *et al.*, 2019).

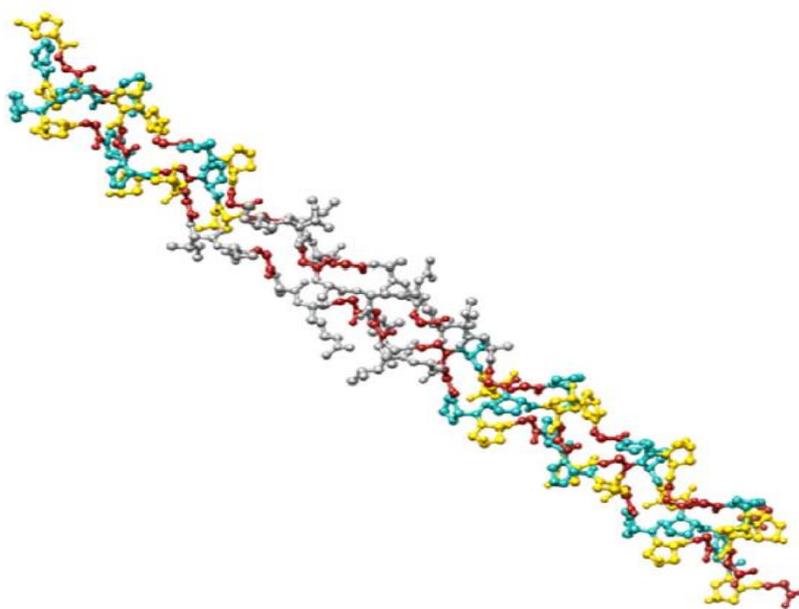
Hidroksil-prolin/hidroksil-lisin selanjutnya dimodifikasi oleh glikosilasi (penambahan galaktosa dan / atau galaktosil-glukosa). Ikatan hidrogen yang kuat antara -NH glisin dan -CO prolin rantai tetangga juga berkontribusi terhadap stabilitas struktur (**Gambar 1**). Untaian kolagen menampilkan penyejajaran “*Quarter Staggered*” yang menunjukkan perpindahan longitudinal dan sedikit pengurangan (<1/4) panjang rantai sehubungan dengan rantai lainnya. Ikatan silang kovalen (histidino-dehydro-hydroxyl-mero-desmosine) memberikan stabilisasi ekstra pada serat-serat ini. Molekul air yang ada dalam struktur akan mempertahankan konformasi kolagen asli. Masing-masing jembatan air terbentuk dan pecah dalam beberapa *picoseconds* dan mencegah pelonggaran wilayah imino. Molekul air yang membentuk ikatan hidrogen tunggal (tulang belakang), merusak struktur heliks, namun cangkang hidrasi yang menutupi seluruh heliks berfungsi sebagai silinder hidrasi yang luas yang mengelilingi residu tripel dan hidroksiprolin, dengan demikian, mendukung koneksi ini. Cangkang hidrasi ini, pelumas biologis, menentukan jarak antar-heliks (**Gambar 1**) (Raman dan Gopakumar, 2018).



Gambar 1. Struktur serat kolagen dan penyusun rantai polipeptida (Sumber: Raman dan Gopakumar, 2018)

Secara umum, warnanya putih, buram, bahan viskoelastisnya dengan daya tarik tinggi dan ekstensibilitas rendah. Titik isoelektriknya berkisar 5,8 dan suhu penyusutan (*shrinkage temperature*) untuk kolagen mamalia diantara 62-65°C, sementara itu suhu penyusutan kolagen ikan diantara 38-54°C. Suhu denaturasi dari kolagen ikan dipertimbangkan bisa lebih rendah dari suhu penyusutan (Raman dan Gopakumar, 2018).





Gambar 2. Struktur kolagen *triple helix*
(Sumber : Rodriguez *et al.*, 2017)

Struktur molekul kolagen bisa hilang melalui proses yang dinamakan denaturasi, atau *kinetic irreversible*, yang menghasilkan rantai polimer yang melingkar secara acak disebut dengan gelatin. Denaturasi bisa dilakukan dengan perlakuan kimia atau panas. Denaturasi kolagen melalui panas sebelumnya dikaitkan dengan berbagai aplikasi. Faktanya, dahulu kolagen diketahui sebagai komponen jaringan ikat yang membentuk gelatin saat pemanasan dan proses tersebut digunakan untuk produksi lem (Silva *et al.*, 2014). Menurut Suptijah *et al.* (2018), denaturasi menyebabkan rantai *triple heliks* kolagen secara transformasi menjadi rantai tunggal α -*heliks* (gelatin). Denaturasi kolagen yang terjadi biasanya bergantung pada habitat dan spesies masing-masing (Safithri *et al.*, 2019).

3.2.3 Tipe Kolagen

Kolagen memaparkan banyak sekali fitur yang unik dan banyak, sebagian besar dan menguntungkan yang dapat dieksploitasi dalam makanan, peralatan medis, dan industri farmasi. Kolagen memiliki organisasi struktural dan hierarkis yang kompleks (Silva *et al.*, 2014). Kolagen saat ini sudah diklasifikasikan menjadi 28 jenis atau tipe yang terbagi menjadi delapan keluarga yang berdasarkan pada struktur, rantai ikatan, dan posisi tubuh manusia. Beberapa klasifikasinya bisa ditemukan pada *fibril-forming*, *basement membrane*, *microfibrillar*, *anchoring fibrils*, *fibril-associated collagen with interrupted triple helix* (FACIT), *transmembrane*,

multiplexins, dan *miscellaneous* (Raman dan Gopakumar, 2018). Hal ini dapat dilihat pada

Tabel 3.

Tabel 3. Tipe kolagen

Keluarga	Tipe	Sebaran
<i>Fibril forming</i>	I	Kulit, tulang, tendon (non tulang rawan), dermis, kornea, ligament
	II	Tulang rawan, <i>vitreous humor</i> , <i>nucleus pulposus</i> , paru-paru, kornea, tulang, kulit
	III	Jaringan ikat (kulit, paru-paru, sistem pembuluh darah, arteri), kulit, <i>vessel wall</i> , serat reticulum jaringan ikat (paru-paru, hati, ginjal)
	V	Kornea, dermis, tulang
	XI	<i>vitreous body</i> , tulang rawan
<i>Basement membrane</i>	IV	<i>Basement membrane</i>
<i>Microfibrillar</i>	VI	Dermis, otot, plasenta, paru-paru, tulang rawan
<i>Anchoring</i>	VII	Kulit, serviks, dermis, kandung kemih
<i>FACIT</i>	IX	Tulang rawan, kornea, <i>vitreous</i>
	XII	Ligamen, tendon, dermis
	XIV	Plasenta, dermis, hati, paru-paru
	XIX	Basement membrane
	XX	Kornea, tendon
	XXI	Dinding pembuluh darah
<i>Transmembrane</i>	XIII	Kulit, pencernaan, paru-paru, dermis
	XVII	Epitel, hemidesmosom kulit
<i>Multiplexins</i>	XV	Ginjal, sel otot halus, pankreas
	XVI	Dermis, ginjal
	XVIII	Hati, paru-paru
<i>Miscellaneous</i>	VIII	Endotelium
	X	Tulang rawan
	XXII	<i>Tissue junction</i>
	XXIII	Transmembran, jantung, retina
	XXIV	Kornea, tulang
	XXV	Otak
	XXVI	Testis, ovarium
	XXVII	Tulang rawan
	XXVIII	Dermis, sel schwann

(Sumber: Raman dan Gopakumar, 2018)

Meskipun sejumlah besar jenis telah ditemukan, hanya tipe pembentuk fibril yang ditemukan yang paling banyak digunakan saat ini. Di industri kosmetik, kolagen adalah bahan baku pilihan untuk formulasi kosmetik karena ketersediaannya, biokompatibilitas, dan biodegradabilitas. Alasan yang menjadikan target pilihan yang sangat baik dalam proses penuaan di bidang kosmetik, karena pada dermis tempat tersedianya kolagen tipe I dan III yang



menyusun 90%. Dari lapisan kulit ini terdistribusi 60%-80% tipe I dan 15%-20% tipe II (Rodriguez *et al.*, 2017).

3.2.4 Sumber Kolagen

Sumber yang bisa dijadikan kolagen adalah sapi, babi, dan sumber laut bisa didapatkan melalui sisik dan kulit ikan. Sebagian besar, kolagen yang terbuat dari sapi dan babi bisa dijadikan sebagai biomaterial. Contoh lain yang saat ini bisa digunakan sebagai sumber kolagen adalah sumber hewan terestrial seperti leher ayam (tipe I, II, III, dan V), tulang rawan sistern embrio (tipe IX), kulit (tipe I dan II), jaringan otot (tipe IV), ekor kangguru, tendon ekor tikus, kaki bebek, kulit kuda, tulang rawan dan fleksor (tipe I dan II), tulang dan kulit buaya, kaki burung, kulit domba, dan kulit katak. Sumber-sumber tersebut bisa dijadikan sebagai kolagen, namun bisa menyebabkan orang yang mengonsumsi bisa terjangkit alergi dan terserang penyakit osteogenesis (Raman dan Gopakumar, 2018).

Berdasarkan dari sumber tersedianya kolagen, sumber perairan menjadi sumber yang paling aman untuk produksi kolagen saat ini. Berdasarkan menurut Raman dan Gopakumar (2018), kolagen hasil laut diakui sebagai sumber alami yang layak diterapkan, hal ini sudah ditetapkan sebagai GRAS (*Generally Recognized as Safe*) oleh FDA. Secara umum, kolagen tersebut terbilang ekonomis dan tidak mempunyai resiko terjangkit penyakit. Kolagen ikan bisa disebut *Piscean collagen*. Salah satu sumber hasil laut yang bisa dijadikan sebagai kolagen adalah ikan, hewan spons, dan *jelly fish*. Hal ini juga didukung oleh Silva *et al.* (2014), kolagen bisa didapatkan pada beberapa sumber dengan cara melalui ekstraksi, diantaranya adalah ikan, invertebrata, dan hewan laut seperti hewan spons atau *jelly fish*. Adapun beberapa contohnya bisa dilihat pada **Tabel 4**.

Berdasarkan **Tabel 4**, kolagen hasil laut ini dipertimbangkan sebagai sumber alternatif untuk bahan pembuatan kolagen. Hal ini disebabkan sumber tersebut tidak ada resiko penyakit seperti kolagen dari babi dan sapi, selain itu rendemen yang bisa didapatkan adalah tinggi. Kolagen hasil laut juga terbatas pada aplikasinya, yang dikarenakan memiliki stabilitas termal yang rendah. Stabilitas termal bergantung pada suhu tubuh dan habitat organisme tinggal (Rodriguez *et al.*, 2017).

3.2.5 Limbah Perikanan sebagai Sumber Alternatif Kolagen

Kolagen dari limbah perikanan dapat diisolasi dari hasil pengolahan ikan, pengolahan non ikan, dan hasil tangkapan sampingan (Coppola *et al.*, 2020). Pemanfaatan kolagen yang berasal dari sisa pengolahan ikan telah banyak dilakukan, antara lain kolagen dari kulit ikan gabus (*Channa striata*) (Wulandari *et al.*, 2015), gelembung renang ikan patin (*Pangasius sp.*) (Simamora *et al.*, 2019), kulit ikan nila hitam (*Oreochromis niloticus*) (Sahubawa dan Putra,

2011; Putra *et al.*, 2013), kulit ikan patin (*Pangasius* sp.) (Suptijah *et al.*, 2018), kulit ikan parang-parang (*Chirocentrus dorab*) (Safithri *et al.*, 2019), sisik ikan gabus (*Channa striatus*) (Pamungkas *et al.*, 2018), sirip ikan tuna ekor kuning (*Thunnus tonggol*) (Hashemi-Jokar dan Salarzadeh, 2014), salmon atlantik (kulit, sirip, sisik, tulang), cod atlantik (kulit, sirip, tulang), dan lumpfish (kulit, sirip, utuh) (Dave *et al.*, 2019). Berdasarkan hasil-hasil sebelumnya, telah menunjukkan bahwa kolagen yang berasal dari limbah pengolahan ikan berpotensi sebagai sumber alternatif untuk produksi kolagen. Beberapa sumber lain yang bisa berpotensi untuk produksi kolagen dapat dilihat pada **Tabel 4**.

Kolagen yang bersumber dari perikanan memiliki keunggulan dibandingkan dengan hewan terestrial darat yang dapat dilihat pada sisi serat protein yang lebih pendek dan struktur molekul yang lebih sederhana sehingga mudah diserap (Simamora *et al.*, 2019). Perbedaan utama antara kolagen ikan dengan kolagen dari hewan-hewan lain adalah nilai biologisnya yang tinggi, kandungan asam amino esensial yang tinggi, dan kandungan hidroksiprolin yang rendah (Romadhon *et al.*, 2019). Sebagai info tambahan, menurut Berhie dan Pandita, (2018), ekstraksi kolagen dari pasokan hewan itu kompleks, memakan waktu dan mahal harganya. Hasil yang diperoleh juga lebih rendah dibandingkan dengan sumber daya lain (sekitar 12 g kolagen dalam 1 kg kain mentah yang digunakan).

Tabel 4. Beberapa sumber perikanan yang berpotensi sebagai kolagen

Sumber	Jaringan	Referensi
Ikan (vertebrata)		
Ikan patin (<i>Pangasius</i> sp.)	Kulit	Devi <i>et al.</i> , 2017
Ikan buntal (<i>Lagocephalus sceleratus</i>)	Kulit	Dogdu <i>et al.</i> , 2019
Ikan <i>stripped cat fish</i> (<i>Pangasionodon hypophthalmus</i>)	Kulit	Singh <i>et al.</i> , 2011
Ikan <i>bonylip barbfish</i> (<i>Osteochilus vittatus</i>)	Kulit	Junianto <i>et al.</i> , 2018
Ikan layar (<i>Istiophorus platypterus</i>)	Kulit	Tamilmozhi <i>et al.</i> , 2013
Ikan <i>spotted golden goat</i> (<i>Parupeneus heptacanthus</i>)	Sisik	Matmaroh <i>et al.</i> , 2011
Ikan <i>L. rohita</i>	Sisik	Das <i>et al.</i> , 2017
Ikan cunang (<i>Muraenesox talabon</i>)	Gelembung renang	Kartika <i>et al.</i> , 2016
Ikan kakap (<i>Lates calcarifer</i>)	Gelembung renang	Sinthusamran <i>et al.</i> , 2013
Ikan tuna ekor kuning (<i>Thunnus albacares</i>)	Gelembung renang	Kaewdang <i>et al.</i> , 2014



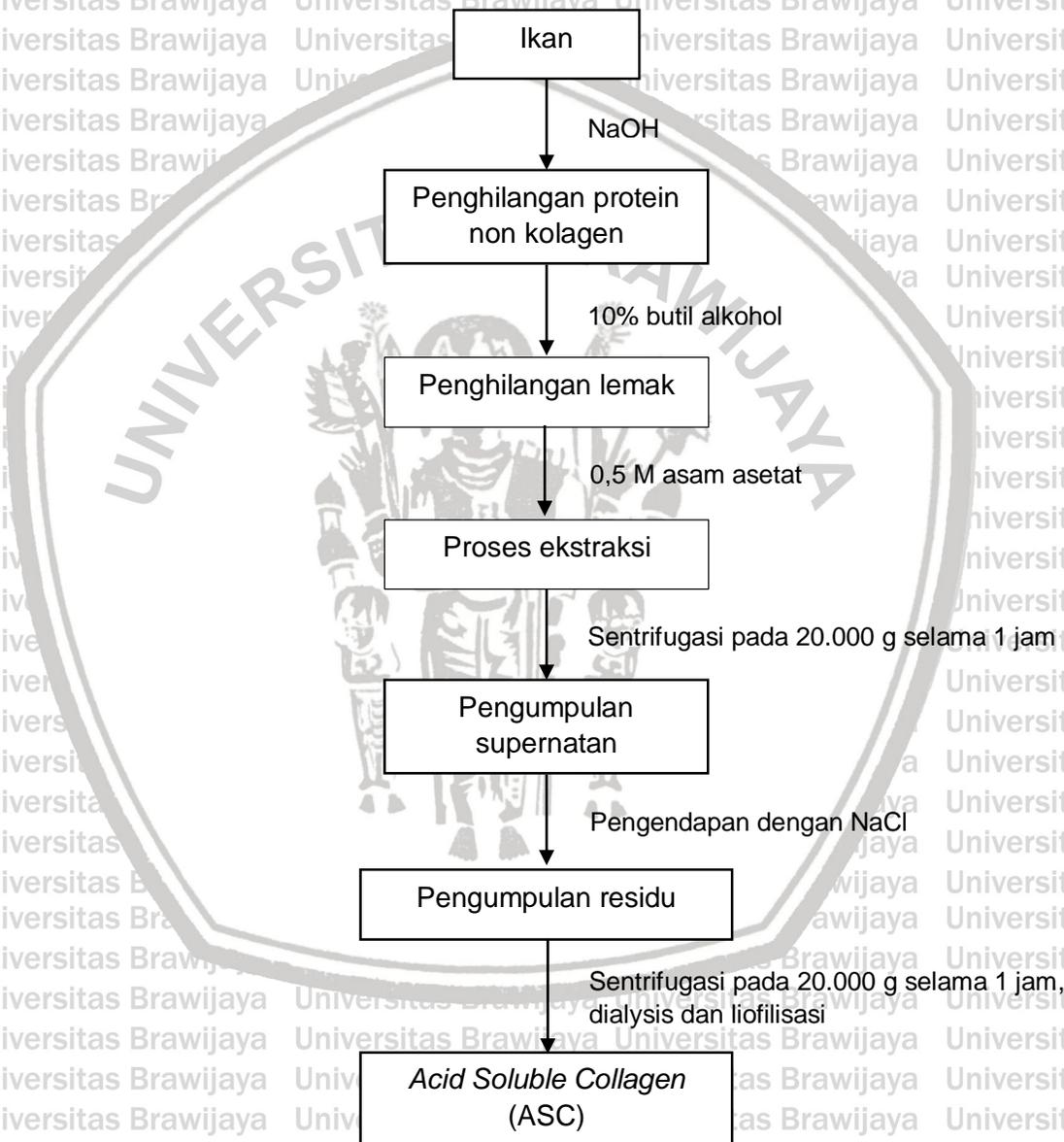
Ikan cakalang (<i>Katsuwonus pelamis</i>)	Kulit dan tulang	Ata <i>et al.</i> , 2016
Ikan nila (<i>Oreochromis niloticus</i>)	Kulit, sisik, dan tulang	Romadhon <i>et al.</i> , 2019; Chen <i>et al.</i> , 2016
Ikan <i>bighead carp</i> (<i>Hypophthalmichthys nobilis</i>)	Kulit, tulang, sirip, gelembung renang, dan sisik	Liu <i>et al.</i> , 2012
Ikan <i>golden carp</i> (<i>probarbus jullieni</i>)	Kulit	Ali <i>et al.</i> , 2018
Ikan sea bass (<i>Lateolabrax japonicus</i>)	Kulit	Kim <i>et al.</i> , 2012; Kim <i>et al.</i> , 2013
Ikan flatfish (<i>Paralichthys olivavaceus</i>)	Kulit	Jung <i>et al.</i> , 2018
Ikan hiu (<i>Mustelus mustelus</i>)	Kulit	Slimane dan Sadok, 2018
Ikan hiu (<i>Chiloscyllium punctatum</i>) dan (<i>Carcharhincus limbatus</i>)	Tulang rawan	Kittiphattanabawon <i>et al.</i> , 2010
Non Ikan (invertebrata)		
Kerang darah (<i>Anadara granosa</i>)	Cangkang	Ariyanti <i>et al.</i> , 2018
Kerang hijau (<i>Mytilus viridis</i>)		
Teripang gama (<i>Stichopus variegatus</i>)	Daging	Safithri <i>et al.</i> , 2020
Cumi-cumi (<i>Loligo uyii</i>)	Kulit terluar	Arumugam <i>et al.</i> , 2011
Jelly fish (<i>Cyanea nozakii</i>)	Utuh	Zhang <i>et al.</i> , 2014
Kishinouye Jelly fish (<i>Rhizostoma pulmo</i> , <i>Cotylorhiza tuberculata</i> , <i>Pelagia noctiluca</i> , <i>Aurelia aurita</i>)	Umbrella, oral arms, dan whole body	Addad <i>et al.</i> , 2011
Star fish (<i>Asterias amurensis</i>)	Utuh	Lee <i>et al.</i> , 2009
Bulu seribu Br (<i>Acanthaster planci</i>)	Body wall	Tan <i>et al.</i> , 2013

3.3 Ekstraksi Kolagen

Metode isolasi atau ekstraksi kolagen dapat dilakukan dengan tiga cara, yaitu melalui kimiawi, kombinasi antara kimiawi dan enzimatis, serta ekstraksi dengan perlakuan *ultrasound*. Ekstraksi kolagen secara kimiawi dapat dilakukan dengan proses asam atau basa. Kolagen yang diekstrak dengan kombinasi asam dan enzim, ada beberapa jenis enzim yang dapat digunakan adalah pepsin, tripsin, pankreatin, fisin, bromelin, dan papain (Nurhayati dan Peranginangin, 2009; Schmidt *et al.*, 2016).

Metode ekstraksi bisa mempengaruhi panjang rantai polipeptida dan sifat fungsional kolagen, seperti viskositas, kelarutan, retensi air, dan kapasitas emulsifikasi. Ini bervariasi sesuai dengan parameter, seperti enzim, suhu, waktu, pH, perlakuan awal, dan bahan baku (Schmidt *et al.*, 2016).

3.3.1 Ekstraksi Acid Soluble Collagen (ASC)



Gambar 3. Flow chart kolagen larut asam (ASC)
(Sumber : Venkatesan *et al.*, 2017)

Penerapan ekstraksi metode asam bisa dilakukan dengan asam organik maupun anorganik. Penggunaan asam anorganik seperti asam klorida dinyatakan kurang efisien dibandingkan dengan asam organik (Safithri *et al.* 2019). Asam organik seperti asam asetat,



asam sitrat, dan asam laktat, sedangkan asam anorganik, yakni *hydrochloroic acid* (HCl). Asam organik mampu melarutkan non ikatan silang kolagen dan memecah beberapa antar ikatan silang intermolekuler di kolagen, sehingga dapat menyebabkan kelarutan tinggi. Pada ekstraksi kolagen dengan kondisi asam, asam yang biasa digunakan adalah asam asetat (Schmidt *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2014). Ekstraksi kolagen baik metode asam maupun enzimatis secara keseluruhan kurang lebih serupa, namun ada sedikit perbedaan dalam kedua ekstraksi tersebut. Sebelum diberlakukannya ekstraksi asam maupun basa, biasanya sumber-sumber tersebut dilakukan perlakuan awal atau preparasi sampel terlebih dahulu (Raman dan Gopakumar, 2018; Silva *et al.*, 2014).

Sumber limbah diawali dengan dibersihkan dari sisa substansi seperti daging yang masih menempel (Nurhayati dan Peranginangin, 2009) dan dilakukan pengurangan ukuran sampel dengan cara memotong atau mencincang sampel yang berguna untuk membantu dalam proses ekstraksi. Perlakuan awal dilakukan sebelum proses ekstraksi dikarenakan sifat dari jaringan ikat terdapat banyak ikatan silang kovalen baik inter dan intramolekuler yang mengakibatkan tingkat kelarutannya sangat lambat, bahkan dalam air mendidih. Oleh karena itu, perlakuan awal dilakukan supaya dapat memutuskan ikatan silang sebelum diekstraksi dan mendapatkan hasil yang tinggi selama proses (Schmidt *et al.*, 2016).

Pada proses perlakuan awal NaOH dan $\text{Ca}(\text{OH})_2$ sering digunakan, namun NaOH menjadi yang terbaik untuk proses perlakuan awal karena dapat menyebabkan pembengkakan yang signifikan (Schmidt *et al.*, 2016; Liu *et al.*). Keefektifan dalam menggunakan larutan ini bergantung pada waktu, suhu, dan konsentrasi larutan. Selain itu, perlakuan awal dengan basa ini bisa digunakan untuk menghilangkan kontaminan lemak, mineral, dan pigmen. Penghilangan lemak dan pigmen bisa juga dengan butil alkohol atau etanol dan khusus untuk sampel jenis tulang serta sisik direkomendasikan menggunakan *ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA) untuk proses demineralisasi yang mampu mengikat mineral yang berlebih (Silva *et al.*, 2014; Nurhayati dan Peranginangin, 2009).

Setelah dari tahapan perlakuan awal sebelum ekstraksi dilanjutkan dengan proses ekstraksi dengan menggunakan asam. Asam yang digunakan biasanya adalah asam asetat. Asam asetat adalah asam yang encer dan paling banyak digunakan untuk melarutkan kolagen. Perlakuan dengan asam ini bertujuan untuk memotong ikatan non kovalen baik intermolekuler dan intramolekuler (Felician *et al.* 2018). Penggunaan asam lemah seperti asam asetat sebagai ekstraksi kolagen bertujuan untuk mencegah terjadinya penurunan kelarutan karena pH yang sangat asam akan menurunkan kelarutannya (Nurhayati dan Peranginangin, 2009). Setelah proses ekstraksi selesai, dilakukan penyaringan untuk memisahkan filtrat atau residu

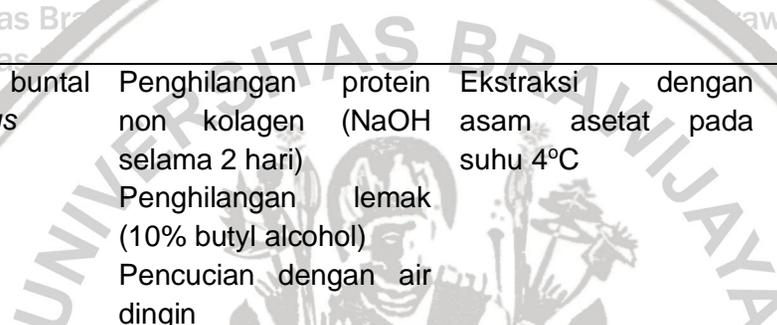
dari larutan, kemudian filtrat dipurifikasi dengan konsep *salting out* menggunakan garam NaCl. Penggunaan garam dengan konsentrasi yang tinggi dapat menyebabkan ditariknya air yang mengelilingi molekul protein, sehingga protein mengendap sebagai residu kolagen basah. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi dan setelah itu pelet atau residu yang diambil. Proses berikutnya adalah dilakukan dialisis pada pelet dan setelah dialisis kolagen diliofilisasi (Ata *et al.* 2016; Sahubawa dan Putra, 2011).

Pada sampel *jellyfish* (sebagian besar tubuh disebut payung, yang terbagi dalam komponen utama yang disebut mesoglea dan kulit luar: *exumbrella* dan *subumbrella*), kolagen yang diperoleh dari mesoglea, mengikuti metodologi berdasarkan solubilisasi dalam asam asetat, biasanya selama tiga hari. Ekstrak kemudian didialisis terhadap larutan Na_2HPO_4 , menghasilkan kolagen yang diendapkan. Kemudian dapat dipisahkan dengan sentrifugasi. Kolagen yang dihasilkan kemudian dapat dimurnikan dengan metode re-presipitasi: pelarutan dalam asam asetat dan presipitasi dengan penambahan NaCl padat. ASC juga dapat dikirimkan ke proses secara enzimatik berupa pepsin, untuk mendapatkan atelo-kolagen (Silva *et al.*, 2014).

Secara umum, proses ekstraksi asam dapat berjalan optimum dengan mendapatkan rendemen tinggi dipengaruhi oleh beberapa variabel, seperti konsentrasi, pH, suhu, dan waktu proses (Schmidt *et al.*, 2016). Kelebihan dari ekstraksi kolagen dengan metode asam adalah prosesnya yang begitu mudah untuk dilakukan (Kartika *et al.*, 2016; Simamora *et al.*, 2019). Dibalik kelebihan dari metode ekstraksi kolagen larut asam, terdapat beberapa kekurangan diantaranya adalah kelarutan dan rendemen yang lebih rendah daripada dengan metode ekstraksi kolagen larut enzim (Nurhayati dan Peranginangin, 2009). Beragam perlakuan ekstraksi metode asam dapat dilihat pada **Tabel 5**.

Tabel 5. Metode ekstraksi *acid soluble collagen* (ASC) dari berbagai sumber

Sumber	Perlakuan Awal	Proses Ekstraksi	Berat Awal	Rendemen (%)	Referensi
Sisik ikan <i>L. rohita</i>	Penghilangan protein non kolagen dan pigmen (0,1 N NaOH 6 jam, rasio 1:10 w/v) Pencucian dengan air dingin sampai pH netral Demineralisasi (0,5 M Na ₂ EDTA (pH 7,4) selama 48 jam, rasio 1:10 w/v)	Ekstraksi dengan 0,5 M asam asetat selama 48 jam pada suhu 4°C	-	-	Universitas B31* Das <i>et al.</i> , 2017
Sisik, kulit, dan tulang ikan nila (<i>Oreochromis niloticus</i>)	Penghilangan protein non kolagen dan lemak (0,1 M NaOH dengan rasio 1:10 pada suhu ruang (32±2°C) selama 3x24 jam Pencucian dengan aquades sampai pH netral	Ekstraksi dengan 0,5 M asam asetat dengan rasio 1:10 pada suhu ruang (32±2°C) selama 3x24 jam	-	0,63 (sisik)** 0,94 (kulit)** 0,53 (tulang)**	Romadhon <i>et al.</i> , 2019
Tulang dan kulit ikan cakalang (<i>Katsuwonus pelamis</i>)	Penghilangan protein non kolagen dan lemak (0,1 M NaOH dengan rasio 1:6 selama 3 x 24 jam) Pencucian dengan aquades hingga pH netral	Ekstraksi dengan 0,5 M asam asetat selama 3 x 24 jam pada suhu kamar	50 gram (kulit dan tulang)	16,71 (tulang)* 14,48 (kulit)*	Ata <i>et al.</i> , 2016



Kulit ikan buntal (<i>Lagocephalus sceleratus</i>)	Penghilangan protein non kolagen (NaOH selama 2 hari) Penghilangan lemak (10% butyl alcohol) Pencucian dengan air dingin	Ekstraksi dengan asam asetat pada suhu 4°C	-	50,9*	Dogdu et al., 2019
Sisik dan kulit ikan nila (<i>Oreochromis niloticus</i>)	Penghilangan protein non kolagen dan pigmen (0,1 M NaHCO ₃ selama 6 jam dengan rasio 1:10) Pencucian dengan air sampai pH netral 7	Ekstraksi dengan 0,5 M asam asetat selama 24 jam	100 gram (sisik dan kulit)	3,2 (sisik)* 27,2 (kulit)*	Chen et al., 2016
Kulit ikan parang-parang (<i>Chirecentrus dorab</i>)	Penghilangan protein non kolagen (0,1 M NaOH dengan rasio 1:10 selama 12 jam) Pencucian dengan aquades sampai pH netral	Ekstrak dengan 0,5 M asam asetat dengan rasio 1:10 selama 48 jam suhu 4°C	-	2,61*	Safithri et al., 2019
Gelembung renang <i>yellowfin tuna</i> (<i>Thunnus albacares</i>)	Penghilangan protein non kolagen (0,15 M NaOH dengan rasio 1:10 w/v, selama 2 jam suhu 4°C) Pencucian dengan air dingin sampai pH netral Penghilangan lemak (10% butil alcohol)	Ekstraksi dengan 0,5 M asam asetat dengan rasio 1:10 (w/v), selama 48 jam suhu 4°C	-	1,07*	Kaewdang et al., 2014

dengan rasio 1:10 w/v
selama 12 jam

Pencucian air dingin
dengan 10 kali jumlah
sampel sebanyak 3 kali

Gelembung renang
ikan cunang
(*Muraenesox
talabon*)

Penghilangan protein
non kolagen, pigmen,
dan lemak (0,1 M NaOH
dengan rasio 1:10 (b/v)
selama 12 jam pada
suhu 4°C)

Pencucian dengan
aquades dingin sampai
pH netral

Ekstraksi dengan 0,5
M asam asetat dengan
rasio 1:10 disertai
dengan agitasi selama
48 jam pada suhu 4°C

10,29*

Kartika *et al.*, 2016

Gelembung renang
ikan kakap (*Lates
calcarifer*)

Penghilangan protein
non kolagen (0,1 M
NaOH dengan rasio
1:10 selama 6 jam

Pencucian dengan air
dingin sampai pH netral
Penghilangan lemak
(10% butil alkohol
dengan rasio 1:10
selama 12 jam)

pencucian
menggunakan air dingin
dengan volume 10 kali
jumlah sampel
sebanyak 3 kali

Ekstraksi dengan 0,5
M asam asetat dengan
rasio 1:50 (w/v)
selama 48 jam pada
suhu 4°C

85,3*

Sinthusamran *et al.*,
2013

Sirip ikan tuna ekor panjang (<i>Thunnus tonggol</i>)	Penghilangan protein non kolagen selama 6 jam Pencucian dengan air destilasi Penghilangan lemak (10% butil alkohol) Pencucian dengan air destilasi	Ekstraksi dengan 0,5 M asam asetat selama 3 hari Diesktrak kembali dengan 0,5 M asam asetat selama 2 hari setelah disentrifugasi	50 gram	7,5**	Hashemi-Jokar dan Salarzadeh, 2014
Kulit ikan hiu (<i>Mustelus mustelus</i>)	Penghilangan protein non kolagen dengan NaOH dengan rasio 1:10 selama 48 jam Pencucian dengan air dingin Penghilangan lemak (10% butanol dengan rasio 1:10 selama 24 jam	Ekstraksi dengan 0,5 M asam asetat dengan rasio 1:10 selama 3 hari Diekstraksi kembali dengan 0,5 M asam asetat dengan rasio 1:10 selama 3 hari pada suhu 4°C	-	23,07*	Slimane dan Sadok, 2018
<i>Cartilage brownbanded bamboo shark</i> (<i>Chiloscyllium punctatum</i>) dan <i>blacktip shark</i>	Penghilangan protein non kolagen dengan NaOH dengan rasio 1:10 selama 6 jam	Ekstraksi dengan 0,5 M asam asetat dengan rasio 1:15 selama 2 hari pada suhu 4°C	100 gram	BBS (1,27)* BTS (1,04)*	Kittiphattanabawon et al., 2010



(*Carcharhincus limbatus*)

Pencucian dengan air dingin
 Penghilangan mineral (0,5 M EDTA dengan rasio 1:10 selama 40 jam
 Pencucian dengan air dingin dengan volume 20 kali sampel sebanyak 3 kali

Kulit terluar cumi-cumi (*Loligo uyii*)

Penghilangan protein non kolagen dengan 0,1 M NaOH selama 3 hari
 Pencucian dengan air destilasi dan diliofilisasi

Ekstraksi dengan 0,5 M asam asetat sebanyak 2 kali selama 3 hari untuk yang pertama dan 2 hari untuk yang kedua

- Universitas 10,54*

Arumugam *et al.*, 2011

Jellyfish (*Cyanea nozakii* K)

Ekstraksi dengan 0,5 M asam asetat selama 3 hari pada suhu 4°C

- Universitas 13*

Zhang *et al.*, 2014

Bovine bone

Perendaman dalam etanol 90% untuk menghilangkan lemak
 Pencucian

Ekstraksi dengan 0,5 M asam asetat dengan rasio 1:5 selama 5 hari pada suhu 4°C

- Universitas 7,9-16,9*

Ferraro *et al.*, 2017

Keterangan:

* : Berat kering





*** : Berat basah
- : Tidak diketahui

Berdasarkan **Tabel 5**. Kolagen yang diekstraksi dari sumber limbah seperti sisik, tulang, kulit, gelembung renang, dan sirip serta non ikan menghasilkan jumlah rendemen yang berbeda-beda. Perbedaan hasil ini bisa disebabkan oleh perbedaan spesies ikan, kondisi biologis, metode preparasi ekstraksi (Pamungkas *et al.*, 2018; Das *et al.*, 2017), dan metode pengeringan (Junianto *et al.*, 2018).

Jika dilihat pada **Tabel 5**. sumber kolagen dari sisik ikan rendemennya bisa mencapai 30%. Rendemen ikan *L. rohita* mencapai 31% (Das *et al.*, 2017), dan ikan nila 3,2% (Chen *et al.*, 2016). Jika dari tulang ikan, rendemen kolagen bisa mencapai sekitar 0,5-17%. Jumlah rendemen pada sampel tulang ikan nila bernilai 0,53% (Romadhon *et al.*, 2019), tulang ikan cakalang 16,71% (Ata *et al.*, 2016), dan tulang rawan (*cartilage*) ikan hiu BBS serta BTS adalah 1,27 % dan 1,04% (Kittiphattanabawon *et al.*, 2010). Pada kolagen kulit ikan buntal memiliki rendemen 50,9% (Dogdu *et al.*, 2019), ikan nila 27,2% (Chen *et al.*, 2016), ikan cakalang 14,48% (Ata *et al.*, 2016), ikan parang-parang 2,61% (Safithri *et al.*, 2019), dan kulit ikan hiu 23,07% (Slimane dan Sadok, 2018). Pada rendemen kolagen di gelembung renang ikan tuna ekor kuning 1,07% (Kaewdang *et al.*, 2014), ikan cunang 10,29% (Kartika *et al.*, 2016), dan ikan kakap 85,3% (Sinthusamran *et al.*, 2013). Kemudian, pada rendemen kolagen sirip ikan tuna ekor panjang 7,5% (Hashemi-Jokar dan Salarzadeh, 2014).

Kolagen yang didapatkan pada sumber non ikan seperti cangkang kerang darah dan hijau memiliki rendemen sekitar 0,22-2% (Ariyanti *et al.*, 2018), lebih rendah dari kulit luar cumi-cumi yaitu 10,54% (Arumugam *et al.*, 2011). Sementara itu, yang memiliki nilai rendemen paling tinggi adalah *Jellyfish*, yakni sekitar 13% (Zhang *et al.*, 2014). Jika melihat rendemen dari kolagen perikanan dengan kolagen mamalia dari tulang sapi, kolagen perikanan terbilang memiliki rendemen yang lebih tinggi. Beberapa sumbernya mampu melebihi rendemennya. Hal ini sesuai dengan pernyataan dari Berhie dan Pandita, (2018), bahwa kolagen dari hewan darat memakan waktu ekstraksi yang lama dan hasil yang rendah.

Faktor penting yang mempengaruhi hasil akhir rendemen kolagen adalah bahan baku, konsentrasi dan waktu perendaman dalam larutan asam asetat, serta konsentrasi larutan untuk menghilangkan protein non kolagen. Konsentrasi asam asetat dapat mempengaruhi pH yang mengatur kerapatan muatan protein yang memodifikasi interaksi elektrostatis dan struktur protein. Asam asetat mampu mengubah struktur tersier kolagen dengan memutuskan ikatan ionik sehingga kolagen dapat larut. Proses ekstraksi juga dipengaruhi oleh waktu, hal ini disebabkan karena waktu sangat menentukan perpindahan molekul zat selama proses difusi.

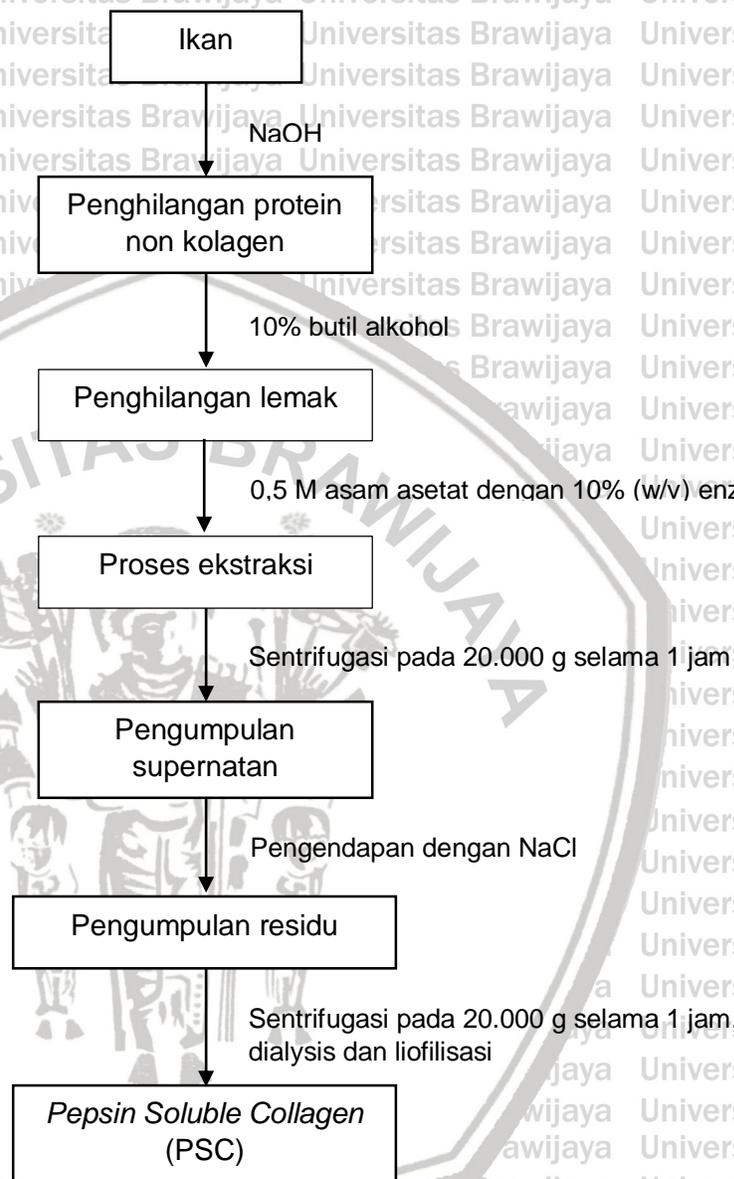
Maka dari itu, tahapan perendaman perlu dilakukan dengan tepat (waktu dan konsentrasinya),

agar tidak terjadi penurunan kelarutan kolagen dan rendemen yang dihasilkan (Ariyanti *et al.*, 2018; Safithri *et al.*, 2020).

Hal lain yang menyebabkan terjadinya perbedaan rendemen ini dikaitkan dengan ikatan silang antar molekul di zona telopeptida yang menyebabkan kolagen kurang larut dalam kondisi asam (Chen *et al.*, 2016). Molekul kolagen dengan ekstraksi ASC sebagian besar diisi oleh ikatan silang kovalen yang disebabkan oleh kondensasi grup aldehid pada zona telopeptida serta ikatan silang antar molekul (Tamilmozhi *et al.*, 2013). Jika pada metode asam didapatkan rendemen yang tinggi >50% bisa disebabkan karena keberhasilannya dalam menghilangkan substansi non kolagen menjadi lebih murni selama proses pra perlakuan (Vijayan *et al.*, 2018). Sebagai tambahan, rendahnya nilai rendemen menurut Romadhon *et al.* (2019), dikarenakan adanya variasi kekuatan ionik. Peningkatan interaksi hidrofobik-hidrofobik antara rantai protein sebagai hasil dari peningkatan kekuatan ionik yang dapat menyebabkan penurunan nilai rendemen yang dihasilkan. Sehingga, perbedaan pada kekuatan ionik dapat mengurangi pelepasan kolagen dari jaringan.



3.3.2 Ekstraksi *Pepsin Soluble Collagen* (PSC)



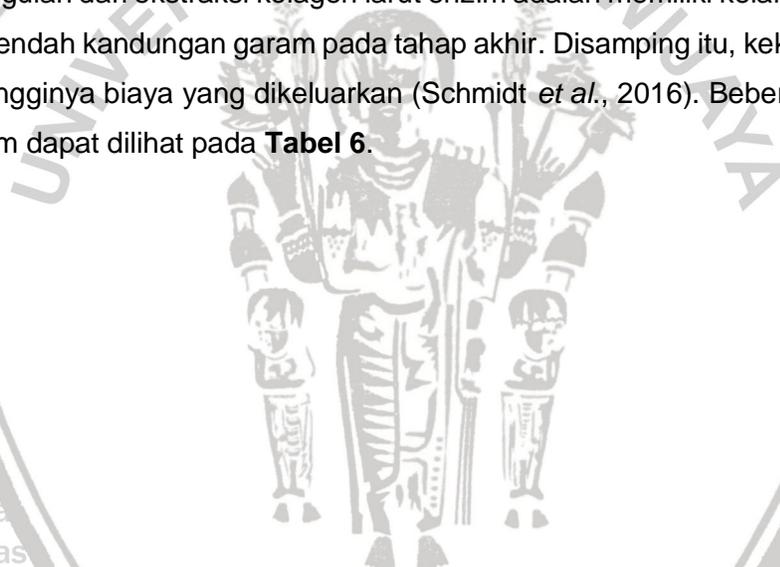
Gambar 4. Flow chart kolagen larut enzim (PSC)

(Sumber : Venkatesan *et al.*, 2017)

Pada umumnya ekstraksi secara asam menghasilkan rendemen yang rendah, untuk mengatasi hal ini perlu ditambahkan perlakuan enzim pada kolagen sehingga membantu dalam proses kelarutan. Beberapa enzimnya adalah tripsin, pancreatin, ficin, bromelin, papain, atau pepsin. Pepsin merupakan enzim yang biasanya selalu digunakan dalam proses ekstraksi tambahan. Ekstraksi yang menerapkan penggunaan pepsin dinamakan *pepsin soluble collagen* (PSC) (Silva *et al.*, 2014).

Proses ekstraksi dengan menggunakan enzim secara keseluruhan kurang lebih serupa seperti dengan ekstraksi asam mulai dari pra perlakuan hingga ekstraksinya yang dapat dilihat pada **sub bab 3.3.1**, halnya saja ada sedikit tambahan pada ekstraksinya. Setelah tahap ekstraksi asam, residu yang tidak larut dalam asam akan diberi penambahan enzim seperti pepsin. Penambahan pepsin dalam asam asetat digunakan untuk memproduksi kolagen yang larut enzim dengan memecah molekul ikatan silang pada zona telopeptida tanpa merusak integritas struktur *triple helix* dengan demikian dapat menghasilkan kelarutan lebih tinggi pada kolagen (Nurhayati dan Peranginangin, 2009). Perlakuan ini sangat berguna, karena membelah peptida secara khusus di daerah telopeptida kolagen, yang merupakan ujung non-heliks, dan dengan demikian, menghidrolisis beberapa protein non-kolagen, akan meningkatkan kemurnian kolagen (Silva *et al.*, 2014; Safithri *et al.*, 2020).

Keunggulan dari ekstraksi kolagen larut enzim adalah memiliki kelarutan, rendemen yang tinggi, dan rendah kandungan garam pada tahap akhir. Disamping itu, kekurangan dari metode ini adalah tingginya biaya yang dikeluarkan (Schmidt *et al.*, 2016). Beberapa proses ekstraksi secara enzim dapat dilihat pada **Tabel 6**.



Tabel 6. Metode ekstraksi pepsin soluble collagen (PSC) dari berbagai sumber

Sumber	Pretreatment	Proses Ekstraksi	Berat Awal	Rendemen (%)	Referensi
Sisik, tulang, dan sirip ikan <i>bighead carp</i> (<i>Hypophthalmichthys nobilis</i>)	Penghilangan protein non kolagen dan pigmen (0,1 M NaOH dengan rasio 1:10 (w/v), selama 36 jam Demineralisasi (0,5 EDTA (pH 7,5) dengan rasio 1:10 (w/v) selama 5 hari Pengilangan lemak (10% butil alkohol dengan rasio 1:10 (w/v), selama 36 jam Pencucian dengan air dingin sampai pH netral	Ekstraksi 0,5 M asam asetat dengan rasio sampel dan pelarut 1:10 (w/v) yang mengandung 0,1% pepsin (w/v) selama 3 hari pada suhu 4°C	500 gram	2,7 (sisik)* 2,9 (tulang)* 5,1 (sirip)*	Liu <i>et al.</i> , 2012
Kulit ikan <i>Bonylip barb</i> (<i>Osteochillus vittatus</i>)	Pencucian dengan air dingin sampai pH netral	Ekstraksi dengan penambahan enzim pepsin + 0,7 M asam asetat selama 24 jam	100 gram	6,18**	Junianto <i>et al.</i> , 2018
Kulit dan gelembung renang ikan <i>bighead carp</i> (<i>Hypophthalmichthys nobilis</i>)	Penghilangan protein non kolagen dan pigmen (0,1 M NaOH selama 36 jam dengan rasio 1:30 w/v)	Ekstraksi 0,5 M asam asetat yang mengandung 0,1% dengan rasio sampel dan pelarut 1:40 (w/v)	125 gram	60,3 (kulit)* 59,0 (gelembung renang)*	Liu <i>et al.</i> , 2012



selama 3 hari pada suhu 4°C

Penghilangan lemak (rasio sampel dengan 10 % butil alkohol 1:30 (w/v) selama 36 jam)

Pencucian dengan air dingin

Kulit ikan layar (*Istiophorus platypterus*)

Penghilangan protein non kolagen (0,1 N NaOH selama 3 hari)

Pencucian dengan air destilasi

Ekstraksi dengan 0,5 M asam asetat selama 72 jam pada suhu 4°C

Material yang tidak larut dalam ASC (Residu hasil ASC) dicuci dengan air dan dilarutkan dalam 0,5 M asam asetat yang mengandung 0,1% pepsin selama 3 hari. Residu diekstrak kembali dengan 0,5 M asam asetat yang mengandung 0,1% pepsin selama 3 hari pada suhu 4°C

2,11**

Tamilmozhi *et al.*, 2013

Gelembung renang *yellowfin tuna* (*Thunnus albacares*)

Penghilangan protein non kolagen (0,15 M NaOH dengan rasio 1:10 w/v, selama 2 jam suhu 4°C)

Ekstraksi dengan 0,5 M asam asetat dengan

12,10*

Kaewdang *et al.*, 2014





rasio 1:10 (w/v), selama 48 jam suhu 4°C

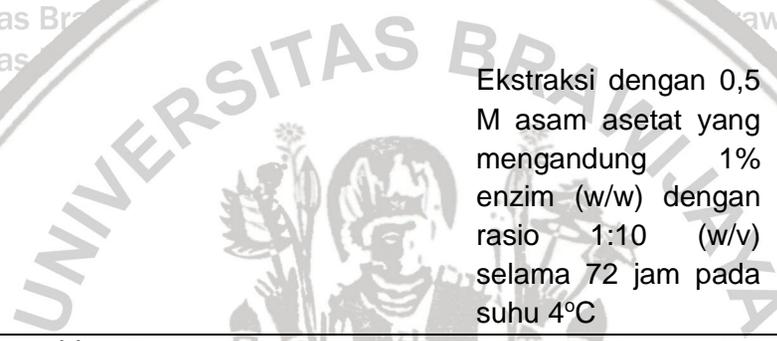
Pencucian dengan air dingin sampai pH netral

Material yang tidak larut oleh ASC diekstrak dengan 0,5 asam asetat + *crude stomach extract* dengan rasio 1:10 (w/v) selama 48 jam suhu 4°C

Penghilangan lemak (10% butil alcohol dengan rasio 1:10 w/v selama 12 jam

Pencucian air dingin dengan 10 kali jumlah sampel sebanyak 3 kali

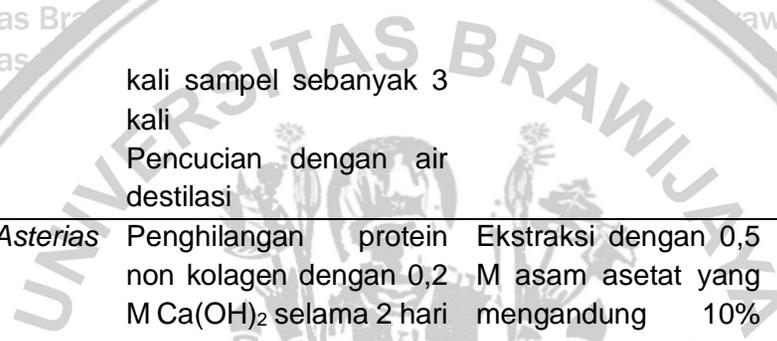
Kulit ikan hiu (<i>Mustelus mustelus</i>)	Penghilangan protein non kolagen (0,1 M NaOH dengan rasio 1:10 selama 48 jam	Ekstraksi dengan 0,5 M asam asetat dengan rasio 1:10 selama 3 hari	35,27*	Slimane dan Sadok, 2018
	Pencucian dengan air dingin	Diekstraksi kembali dengan 0,5 M asam asetat dengan rasio 1:10 selama 3 hari		
	Penghilangan lemak (10% butanol dengan rasio 1:10 selama 24 jam	Material yang tidak larut (residu 2) dicuci dengan air		



Ekstraksi dengan 0,5 M asam asetat yang mengandung 1% enzim (w/w) dengan rasio 1:10 (w/v) selama 72 jam pada suhu 4°C

<p><i>Cartilage ikan hiu brownbanded bamboo shark (Chiloscyllium punctatum) dan blacktip shark (Carcharhincus limbatus)</i></p>	<p>Penghilangan protein non kolagen (0,1 M NaOH dengan rasio 1:10 selama 6 jam</p>	<p>Ekstraksi dengan 0,5 M asam asetat dengan rasio 1:15 selama 2 hari</p>	<p>BBS (9,59)* BTS (10,30)*</p>	<p>Kittiphattanabawon et al., 2010</p>
	<p>Pencucian dengan air dingin</p>	<p>Material yang tidak larut digunakan sebagai ekstraksi PSC, diekstraksi dengan 0,5 M asam asetat yang mengandung pepsin babi dengan rasio 1:15 selama 48 pada suhu 4°C</p>		
	<p>Penghilangan mineral (0,5 M EDTA dengan rasio 1:10 selama 40 jam</p>			
	<p>Pencucian dengan air dingin dengan volume 20</p>			





kali sampel sebanyak 3 kali

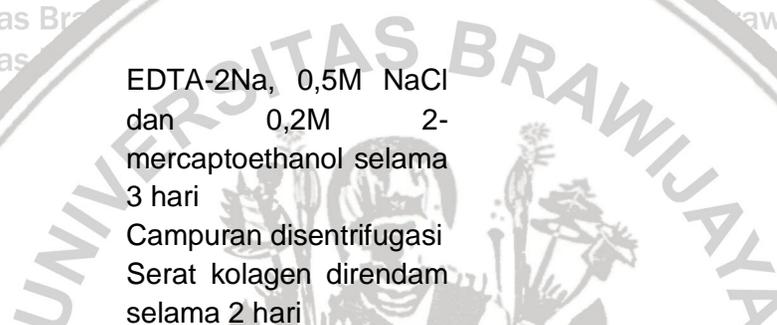
Pencucian dengan air destilasi

<i>Starfish (Asterias amurensis)</i>	Penghilangan protein non kolagen dengan 0,2 M Ca(OH) ₂ selama 2 hari	Ekstraksi dengan 0,5 M asam asetat yang mengandung 10% pepsin selama 2 hari pada suhu 4°C	5,8**	Lee et al., 2009
Pencucian dengan air destilasi				

<i>Body wall (Acanthaster planci)</i>	Bulu seribu Penghilangan protein non kolagen dengan 0,1 M NaOH dengan rasio 1:10 (w/v) selama 3 hari	Serat kolagen direndam dalam 0,5 M asam asetat dengan rasio 1:10 (w/v) selama 2 hari	2,29*	Tan et al., 2013
Pencucian dengan air destilasi				

Demineralisasi dengan 0,05 M Tris HCl yang mengandung 0,5 M EDTA-2Na dan dan dipilah dengan Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0) mengandung 0,05 M





EDTA-2Na, 0,5M NaCl
 dan 0,2M 2-
 mercaptoethanol selama
 3 hari
 Campuran disentrifugasi
 Serat kolagen direndam
 selama 2 hari

Kulit terluar cumi-cumi (<i>Loligo uyii</i>)	Penghilangan protein non kolagen dengan 0,1 M NaOH selama 3 hari Pencucian dengan air destilasi dan diliofilisasi	Ekstraksi dengan 0,5 M asam asetat sebanyak 2 kali selama 3 hari untuk yang pertama dan 2 hari untuk yang kedua Residu yang tidak larut, direndam lagi dalam 0,5 M asam asetat yang mengandung 10% pepsin pada suhu 4°C selama 48 jam	31,16*	Arumugam <i>et al.</i> , 2011
Jellyfish (<i>Cyanea nozakii</i> K)		Ekstraksi dengan 0,5 M asam asetat selama 3 hari Ekstraksi dengan 0,5 M asam asetat dengan rasio 1:10 dan pepsin 0,1% selama 3 hari pada suhu 4°C	5,5*	Zhang <i>et al.</i> , 2014

Keterangan :

* : Berat kering





*** : Berat basah
- : Tidak diketahui

Berdasarkan **Tabel 6**. Rendemen kolagen hasil ekstraksi secara enzimatis berbeda-beda, hal ini dapat disebabkan karena spesies ikan, kondisi biologis, dan metode preparasi ekstraksi (Pamungkas *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2012). Dapat dilihat bahwa rendemen kolagen dari kulit bisa mencapai 60%. Ikan *bonylip barb fish* memiliki rendemen 6,18% (Junianto *et al.*, 2018), ikan *bighead carp* 60,3% (Liu *et al.*, 2012), ikan layar 2,11% (Tamilmozhi *et al.*, 2013), dan ikan hiu 35,27% (Slimane dan Sadok, 2018). Rendemen sisik ikan *bighead carp* mencapai 2,7% (Liu *et al.*, 2012). Pada kolagen dari sirip, tulang, dan gelembung renang ikan *bighead carp* masing-masing memiliki rendemen 5,1%, 2,9%, dan 59% (Liu *et al.*, 2012), gelembung renang ikan tuna ekor kuning 12,10% (Kaewdang *et al.*, 2014), dan tulang rawan (*cartilage*) ikan hiu BBS dan BTS adalah 9,59% dan 10,30% (Kittiphattanabawon *et al.*, 2010). Sementara itu, kolagen yang berasal dari non ikan, yaitu kulit terluar cumi-cumi memiliki rendemen 31,16% (Arumugam *et al.*, 2011), *starfish* 5,8% (Lee *et al.*, 2009), *jellyfish (Cyanea nozakii)* 5,5% (Zhang *et al.*, 2014), dan bulu seribu 2,29% (Tan *et al.*, 2013).

Berdasarkan hasil rendemen yang diperoleh masing-masing spesies dengan sumber yang berbeda menyatakan bahwa dengan penggunaan pepsin, molekul ikatan silang di zona telopeptida dipecah yang dapat meningkatkan hasil rendemen ekstraksi kolagen (Tamilmozhi *et al.*, 2013; Kaewdang *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2012; Nurhayati dan Peranginangin, 2009). Penggunaan pepsin konsentrasi 0,1% menurut Matmaroh *et al.*, (2011) dan Pamungkas *et al.* (2018), dinyatakan efektif dapat melarutkan kolagen yaitu dengan memecah ikatan silang pada telopeptida tanpa merusak struktur *triple helix*.

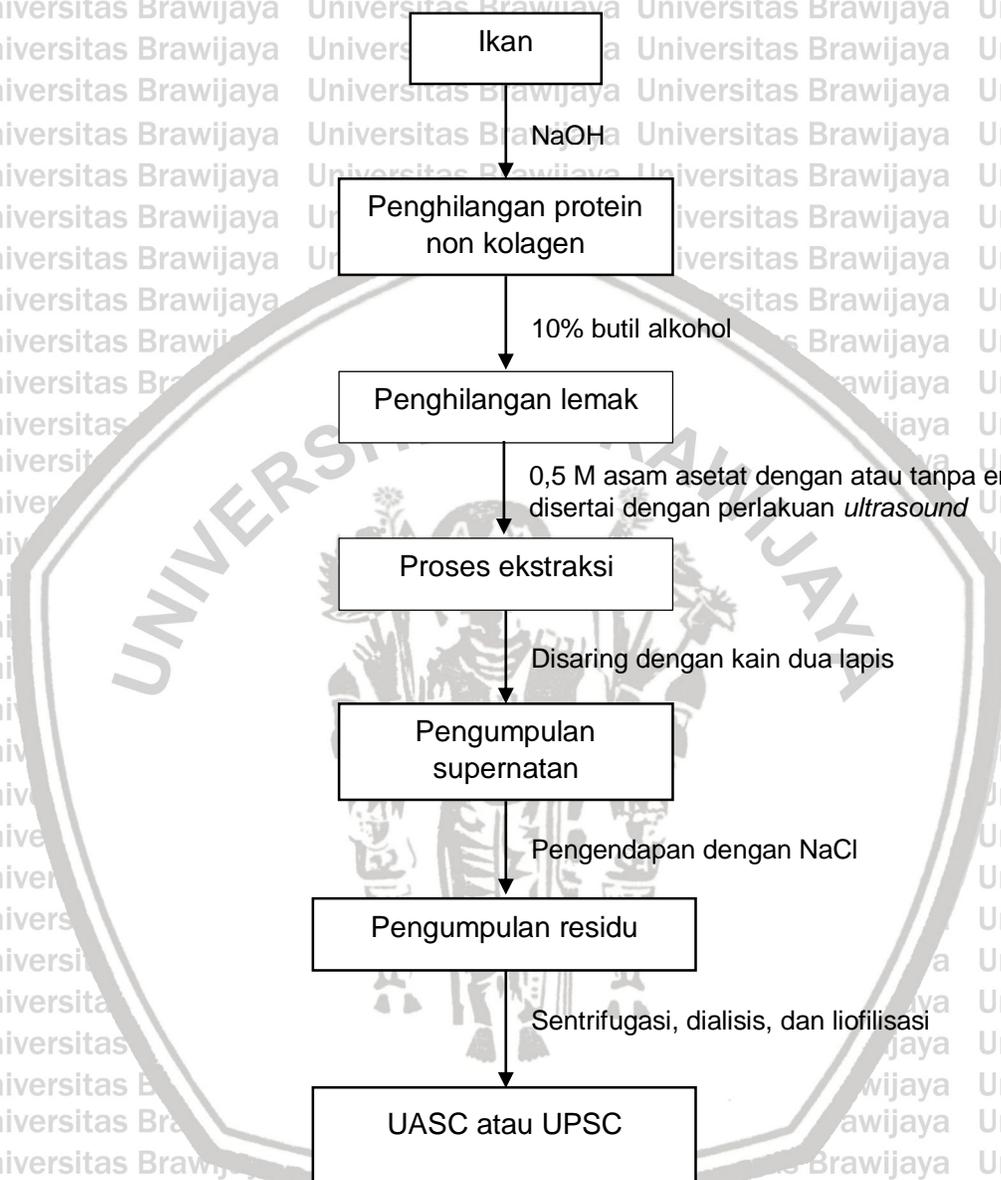
Dapat dinyatakan kembali bahwa perbedaan keefektifan dalam ekstraksi secara enzimatis bergantung pada spesies ikan, komposisi kolagen dan konfigurasi, dan jumlah pepsin yang digunakan (Matmaroh *et al.*, 2011). Hal ini dapat dilihat pada **Tabel 6**. bahwa hasil ekstraksi PSC juga bisa mendapatkan rendemen yang rendah dari ekstraksi ASC, seperti ikan layar, hal ini bisa disebabkan karena sumber dari masing-masing spesies ada yang memiliki lebih variasi ikatan silang pada serat kolagen dan mengandung tinggi ikatan silang. Sehingga, hasil ekstraksi dapat lebih rendah kelarutannya meskipun beberapa sudah dipotong dengan enzim pepsin (Kaewdang *et al.*, 2014). Selain itu, bisa disebabkan pada zona telopeptida tidak mengandung banyak ikatan silang (Zhang *et al.*, 2014).

Jika melihat dari kedua ekstraksi baik dari metode ASC dan PSC, untuk ekstraksi secara ASC secara normal mengandung struktur molekul kolagen yang utuh dengan ditandai kehadiran ikatan silang intermolekuler. Sehingga dapat dinyatakan karena dengan meningkatnya ikatan silang pada molekul kolagen dapat menyebabkan kurang larutnya kolagen terhadap pelarut seperti asam dan garam. Kolagen dapat memiliki kelarutan yang

tinggi apabila sudah dilakukannya proses enzimatis dengan mengubah struktur kolagen dan mengurangi panjang rantai kolagen (Jamilah *et al.*, 2013). Ekstraksi kolagen dengan metode PSC menghasilkan rendemen lebih banyak dibandingkan dengan metode ASC, hal ini disebabkan karena enzim memiliki aktivitas tinggi dan karakteristik khusus dalam pemotongan atau penguraian secara sempurna asam amino pembentuk rantai peptida protein kolagen (Putra *et al.*, 2013). Sebagai tambahan, menurut Suptijah *et al.* (2018) bahwa adanya perbedaan nilai rendemen ini disebabkan oleh perbedaan metode ekstraksi, konsentrasi larutan untuk menghilangkan protein non kolagen, jenis bahan, suhu, dan lama waktu produksi.



3.3.3 Ekstraksi Kolagen *Ultrasound*



Gambar 5. *Flow chart* metode ekstraksi *ultrasound*
(Sumber: Ali *et al.*, 2018)

Ekstraksi dengan *ultrasound* menurut Schmidt *et al.* (2016), merupakan proses yang menggunakan energi gelombang suara yang dihasilkan pada frekuensi yang lebih tinggi dari kapasitas pendengaran manusia (>16 kHz). Ekstraksi *ultrasound* banyak digunakan untuk meningkatkan transfer massa melalui proses basah. Menurut Kim *et al.* (2012), perlakuan gelombang ultrasonik menghasilkan sejumlah besar energi dari kavitasasi yang disebabkan oleh getaran. Perlakuan ini meningkatkan energi kinetik partikel-partikel dalam zat, karena suhu

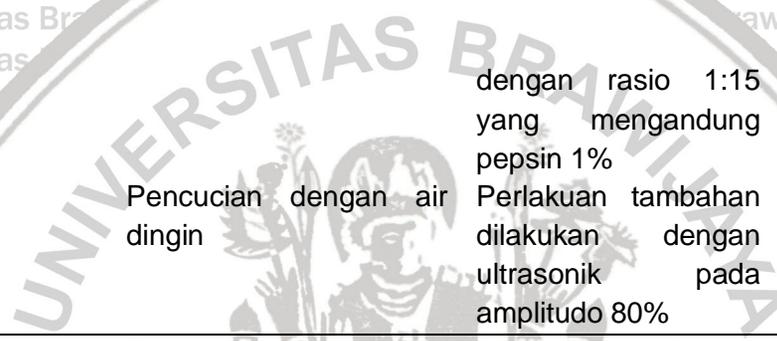
lokal yang tinggi, yang menyediakan energi yang cukup untuk reaksi yang dapat digunakan secara efektif dalam proses ekstraksi, karena efek kejutan energi ultrasonik.

Pada proses ekstraksi yang menggunakan ultrasonik memiliki keunggulan berupa dapat mengurangi waktu proses dan meningkatkan hasil (Schmidt *et al.*, 2016). Menurut Jung *et al.* (2018), ekstraksi kolagen dengan ultrasonik dapat mendapatkan rendemen yang tinggi meskipun dengan mengurangi jumlah asam yang digunakan. Namun, penggunaan ekstraksi ultrasonik skala industri tidak pernah dicoba karena kurangnya ekstrakstor industri. Beberapa proses ekstraksi dengan *ultrasound* dapat dilihat pada **Tabel 7**.



Tabel 7. Metode ekstraksi kolagen ultrasound dari berbagai sumber

Sumber	Pretreatment	Proses Ekstraksi	Berat Awal	Rendemen (%)	Referensi
Kulit ikan sea bass (<i>Lateolabrax japonicas</i>)	Pemotongan sampel	Ekstraksi dengan asam asetat 0,5 M dengan rasio 1:200 selama 24 jam dan disertai perlakuan ultrasonik dengan amplitudo 20, 40, 60, 80% suhu 4°C	-	20% (45)* 40% (70)* 60% (85)* 80% (93)*	Kim <i>et al.</i> , 2012
	Pencucian dengan air dingin Perendaman dalam larutan 0,5 M NaCl dengan rasio 1:20 (w/v) selama 10 menit Penghilangan lemak dengan etanol				
Kulit ikan golden carp (<i>Probarbus jullieni</i>)	Perendaman dengan 0,1 M NaOH dengan rasio 1:15 selama 8 jam pada suhu 4°C	Untuk ekstraksi Asam (UASC). Perendaman dengan 0,5 M asam asetat rasio 1:15 selama 48 jam suhu 4°C	100 gram	UASC (81,53%)* UPSC (94,88%)*	Ali <i>et al.</i> , 2018
	Pencucian dengan air dingin Penghilangan lemak dengan 10% butil alkohol dengan rasio 1:15 selama 16 jam	Perlakuan tambahan dilakukan dengan amplitudo 20, 50, 80% Untuk ekstraksi enzim (UPSC). Perendaman dengan 0,5 M asam asetat			



		dengan rasio 1:15 yang mengandung pepsin 1%		
	Pencucian dengan air dingin	Perlakuan tambahan dilakukan dengan ultrasonik pada amplitudo 80%		
	Perendaman dengan 0,5 M NaCl dengan rasio 1:10	Ekstraksi dengan 0,05 M asam asetat dengan rasio 1:100 (w/v) pada suhu 4°C dengan amplitudo 60% selama 1,5 dan 3 jam	1,5 jam (31,3%) 3 jam (46,2%)	Jung <i>et al.</i> , 2018
Kulit ikan flatfish (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	Perendaman dalam etanol dengan rasio 1:20			
	Perendaman dengan 0,5 M NaCl dengan rasio 1:20 (w/v)	Perendaman dengan asam asetat (0,1 M; 0,05 M; 0,01 M) dengan rasio 1:200 (w/v) disertai dengan perlakuan ultrasonik dengan amplitudo 20, 40, 60, 80% pada suhu 4°C selama 24 jam.	0,1 M 20% (32,57)* 40% (65,69)* 60% (76,92)* 80% (90,40)* 0,05 M 20% (32,47)* 40% (47,16)* 60% (60,64)* 80% (66,82)* 0,01 M 20% (12,91)* 40% (21,34)* 60% (30,32)* 80% (34,25)*	Kim <i>et al.</i> , 2013
Kulit ikan sea bass (<i>lateolabrax japonicus</i>)				



	Penghilangan lemak dengan etanol	Perendaman dengan asam asetat disertai dengan perlakuan ultrasonik	1000 gram	509 gram**	Zou <i>et al.</i> , 2017
<i>Soft shelled turtle (Pelodiscus sinensis)</i>	Perendaman dalam NaCl yang mengandung Tris-HCl dengan rasio 1:20 selama 12 jam Penghilangan mineral dengan EDTA-2Na dengan rasio 1:20 selama 24 jam				

Keterangan:

- * = berat kering
- ** = Berat basah
- = Tidak diketahui



Berdasarkan **Tabel 7**. Rendemen kolagen hasil ekstraksi dengan perlakuan ultrasonik berbeda-beda. Dapat dilihat bahwa rendemen kolagen dengan perlakuan tambahan ultrasonik rendemennya mampu mencapai 90%. Pada kulit ikan *sea bass* memiliki rendemen sekitar 45-93% (Kim *et al.*, 2012), kulit ikan *golden carp* yang diekstrak dengan asam dan enzim memiliki rendemen sekitar 81,53% dan 94,88% (Ali *et al.*, 2018), kulit ikan *flatfish* memiliki rendemen sekitar 31,3-46,2% (Jung *et al.*, 2018), kulit ikan *sea bass* memiliki rendemen sekitar 12,91-90,40% (Kim *et al.*, 2013), dan *soft shelled turtle* memiliki rendemen sekitar 509 g/kg (Zou *et al.*, 2017).

Berdasarkan hasil rendemen yang diperoleh masing-masing sumber yang berbeda menyatakan bahwa perlakuan ultrasonik dapat meningkatkan rendemen yang tinggi. Hasil ini bergantung pada amplitudo dan durasi perlakuan ultrasonik. Tingginya rendemen juga bisa disebabkan karena perlakuan ultrasonik merubah struktur serat kolagen dan memecah strukturnya (Kim *et al.*, 2012). Bahkan dengan tambahan pepsin pada ekstraksi kolagen dengan ultrasonik juga akan membantu untuk meningkatkan rendemen ekstraksi. Hal ini disebabkan dengan penggunaan pepsin, molekul ikatan silang di zona telopeptida dipecah yang dapat meningkatkan hasil rendemen ekstraksi kolagen (Tamilmozhi *et al.*, 2013; Kaewdang *et al.*, 2014). Namun, dapat dinyatakan kembali bahwa rendemen hasil ekstraksi juga bergantung pada jumlah pepsin yang digunakan (Matmaroh *et al.*, 2011).

Jika dilihat secara keseluruhan dari ekstraksi ini dibandingkan dengan ekstraksi secara ASC atau PSC bisa dikatakan prosesnya lebih efisien dan efektif. Hal ini dikarenakan mampu menghasilkan rendemen yang tinggi dalam waktu yang lebih singkat meskipun dengan konsentrasi yang rendah (Kim *et al.*, 2013). Pada perlakuan ultrasonik juga memberikan efek kavitasi yang dapat melonggarkan bagian sampel, sehingga pelarut dapat menembus bagian dalam lebih efektif dan mampu lebih mengekstrak kolagen. Selain itu, untuk perlakuan kombinasi antara ultrasonik dengan tambahan pepsin dalam jumlah yang efektif, dinilai mampu meningkatkan hasil dan mengurangi waktu proses (Ali *et al.*, 2018).

3.3.4 Faktor yang Mempengaruhi Ekstraksi Kolagen ASC, PSC, dan *Ultrasound*

• Suhu

Suhu ekstraksi akan mempengaruhi proses ekstraksi kolagen baik ASC, PSC, dan *ultrasound*. Pemakaian suhu diatas 60-70°C mampu membuat serabut kolagen menyusut, sehingga proses ekstraksi dilakukan dibawah suhu penyusutan. Maka dari itu, ekstraksi kolagen ada yang menggunakan suhu 4°C, 22-23°C, dan juga suhu kamar. Rendahnya suhu yang digunakan pada proses ekstraksi ini didasarkan oleh rendahnya suhu denaturasi kolagen (Nurhayati dan Peranginangin, 2009). Untuk ekstraksi kolagen ASC penggunaan suhu 4°C

bertujuan untuk menghindari atau meminimalisir terjadinya denaturasi pada kolagen selama proses ekstraksi berlangsung. Hal ini diketahui bahwa suhu denaturasi kolagen ikan lebih rendah dari kolagen mamalia (Silva *et al.*, 2014). Kemampuan kolagen yang rentan terhadap suhu ini dihubungkan dengan struktur kimia yang dikarenakan adanya perbedaan pada komposisi asam amino terutama variasi asam amino prolin dan hidroksiprolin diberbagai spesies ikan. Komposisi asam imino (prolin dan hidroskiprolin) berperan sebagai stabilitas struktur heliks kolagen. Meningkatnya kandungan asam amino ini dapat membuat lebih stabil (Jamilah *et al.*, 2013).

Pada ekstraksi kolagen PSC juga diketahui untuk menggunakan suhu rendah selama proses ekstaksi berlangsung. Penggunaan suhu rendah ini selain bertujuan untuk menghindari terjadinya denaturasi kolagen pada sampel, juga digunakan untuk mencegah enzim rusak atau terdegradasi yang berguna membantu meningkatkan kelarutan kolagen (Felician *et al.*, 2018). Untuk ekstraksi kolagen dengan perlakuan tambahan ultrasonik baik dengan asam maupun enzim juga dilakukan dengan suhu rendah. Hal ini dikaitkan untuk mencegah terjadinya denaturasi kolagen dan mencegah enzim yang digunakan rusak (Ali *et al.*, 2018).

- **Penambahan Enzim**

Penggunaan enzim pada ekstraksi PSC ini berperan besar untuk menghasilkan rendemen yang tinggi. Ekstraksi kolagen dengan asam-enzim diharapkan mampu menghasilkan rendemen yang lebih dari ekstraksi asam. Hal ini disebabkan karena enzim mampu memutus ikatan silang pada ujung non heliks kolagen, selain itu ujung telopeptida pada rantai polimer juga terputus sehingga kelarutan kolagen dalam pelarut asam meningkat (Safithri *et al.*, 2020). Diketahui perbedaan kemampuan pepsin untuk mengekstrak kolagen diduga dipengaruhi oleh spesies ikan, konfigurasi dan komposisi kolagen, serta jumlah dan sumber pepsin yang digunakan (Pamungkas *et al.*, 2018). Dapat dilihat pada ekstraksi kolagen dengan penambahan pepsin 0,1% pada kulit ikan layar dan *bighead carp* menghasilkan rendemen 2,11% dan 60,3% (Tamilmozhi *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2012). Dengan penambahan pepsin 1% pada kulit ikan hiu dan sisik ikan *stripped catfish* menghasilkan rendemen 35,27% dan 1,2% (Slimane dan Sadok, 2018; Matmaroh *et al.*, 2011). Sedangkan, pada penambahan pepsin 10% pada bintang laut dan kulit terluar cumi-cumi yang menghasilkan rendemen 5,8% dan 31,10% (Lee *et al.*, 2009; Arumugam *et al.*, 2011).

Pada penggunaan enzim ekstraksi kolagen dengan tambahan ultrasonik juga berperan besar untuk meningkatkan nilai rendemen kolagen. Pada penelitian Ali *et al.* (2018), melaporkan bahwa ekstraksi kolagen ultrasonik dengan tambahan pepsin 1% meningkatkan

nilai rendemen mencapai 94,88% daripada ekstraksi kolagen ultrasonik yang hanya dengan asam yakni mencapai 81,53%.

- **Rasio Pelarut NaOH dengan Sampel**

Perlakuan awal baik ASC, PSC, dan *ultrasound* yang menggunakan NaOH ini bertujuan untuk menghilangkan protein non kolagen dan menghilangkan para kontaminan seperti lemak, mineral, dan pigmen (Safithri *et al.*, 2019). Proses perlakuan awal merupakan proses yang sangat berpengaruh terhadap kemurnian kolagen yang diisolasi, efisiensi waktu, dan biaya isolasi kolagen. Dapat diketahui bahwa jenis ikan memiliki komposisi protein yang berbeda yang dipengaruhi oleh habitatnya. Hal tersebut menyebabkan setiap ikan memiliki kondisi optimal praperlakuan dan hidrolisis yang berbeda-beda (Devi *et al.*, 2017). Hal ini dapat dilihat pada ekstraksi ASC dan PSC akan memiliki kondisi optimal yang berbeda-beda untuk mendapatkan rendemen. Ekstraksi ASC sisik ikan *stripped catfish* dengan rasio 1:10 mendapatkan rendemen 0,46%, kulit ikan hiu (23,02%) (Slimane dan Sadok, 2018), dan gelembung renang ikan kakap mendapatkan rendemen yang jauh lebih tinggi sebesar 85,3% (Sinthusamran *et al.*, 2013). Sebaliknya, menurut Ata *et al.* (2016), tulang ikan cakalang dengan rasio 1:6 mendapatkan rendemen yang cukup tinggi sebesar 16,71%.

Pada ekstraksi PSC gelembung renang ikan tuna ekor kuning dengan rasio 1:10 mendapatkan rendemen sebesar 12,10% (Kaewdang *et al.*, 2014), kulit ikan hiu (35,27%) (Slimane dan Sadok, 2018). Sebaliknya, menurut Junianto *et al.* (2018), kulit ikan *bonylip barb* dengan rasio 1:20 mendapatkan rendemen sebesar 6,18% dan menurut Liu *et al.* (2012), kulit ikan *bighead carp* rasio 1:30 mendapatkan rendemen sebesar 60,3%. Perbedaan ini bisa disebabkan karena spesies, habitat, perlakuan awal, dan metode ekstraksi (Junianto *et al.*, 2018).

- **Konsentrasi NaOH sebagai Perlakuan Awal**

Pada proses ekstraksi dengan perlakuan awal yang menggunakan NaOH baik ASC, PSC, dan *ultrasound* ini berperan untuk menyebabkan pengembangan pada sampel secara signifikan dibandingkan dengan pelarut alkali lain (Astiana *et al.*, 2016). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Simamora *et al.* (2019), melaporkan bahwa penggunaan beragam konsentrasi NaOH yang terdiri dari 0,05 M; 0,1 M; dan 0,15 M untuk perlakuan awal ekstrak kolagen, dinyatakan yang efektif adalah konsentrasi 0,05 M. Penggunaan konsentrasi NaOH 0,05 M dilaporkan efektif dan stabil dalam melarutkan protein non kolagen. Sedikit berbeda dengan yang dilaporkan oleh Gadi *et al.* (2017), bahwa diantara konsentrasi antara 0,1 M; 0,15 M; 0,2 M yang dipilih karena mampu membuat stabil dan efektif adalah 0,1 M. hal ini kurang lebih serupa dengan menurut Schmidt *et al.* (2016), menyatakan bahwa konsentrasi

NaOH yang efektif dalam menghilangkan protein non kolagen dan memodifikasi strukturnya adalah 0,05 M-0,1 M, sedangkan konsentrasi 0,2 M dan 0,5 M dapat menyebabkan kehilangan protein target dan merubah tatanan struktur kolagen.

Larutan NaOH dipilih sebagai deproteinasi karena sifat protein yang larut dalam NaOH dan dapat menyebabkan pengembangan pada kulit ikan patin dibandingkan dengan larutan alkali lain. Gugus OH^- yang berikatan dengan protein menyebabkan migrasi protein dan komponen pengotor lain yang terdapat dalam matrik kolagen. Menurut Wulandari *et al.*, (2015) dan Liu *et al.* (2014), efisiensi *pretreatment* dalam larutan NaOH dipengaruhi oleh waktu, suhu, konsentrasi NaOH, dan bahan baku yang digunakan.

- **Durasi Perlakuan Awal NaOH**

Pra perlakuan kolagen menurut Suptijah *et al.* (2018), yang dilakukan dengan variasi waktu perendaman yang beragam mulai dari 2, 4, 6, 8, 10, dan 12 jam, bahwasannya menunjukkan hasil pada 2 jam pertama terjadi kehilangan banyak protein non kolagen. Penghilangan jumlah protein non kolagen semakin berkurang yang ditunjukkan dengan semakin kecilnya nilai konsentrasi protein dalam larutan NaOH. Hal yang serupa dialami oleh Simamora *et al.* (2019) dan Devi *et al.* (2017), yang melaporkan bahwa penghilangan protein non kolagen terbanyak pada perendaman di 2 jam pertama dan akan menurun seiring dengan penambahan waktu perendaman.

Berdasarkan Devi *et al.* (2017), menyatakan bahwa hubungan antara konsentrasi NaOH dan lama waktu perendaman berpengaruh nyata terhadap konsentrasi protein terlarut. NaOH memiliki kemampuan dalam menghilangkan protein non kolagen dan lemak, serta mampu meminimalkan kelarutan protein kolagen. Menurut Gadi *et al.* (2017), melaporkan bahwa semakin lama waktu perendaman maka mengakibatkan jumlah protein terlarut meningkat, sehingga yang diduga bukan hanya protein non kolagen yang terlarut tetapi juga protein kolagen. Terjadinya peningkatan konsentrasi protein yang terlarut ini mengindikasikan bahwa sebagian kolagen mulai ikut terlarut dalam larutan NaOH. Penyebabnya adalah karena kelebihan konsentrasi OH^- yang mengakibatkan terputusnya sebagian ikatan kovalen pada struktur kolagen. Hal ini didasarkan pada kandungan NaOH sendiri yang memiliki peranan dalam pemisahan untaian dari batang-batang serat kolagen. Selain itu, larutan alkali akan menyerang wilayah telopeptida dari struktur kolagen selama proses perlakuan awal, sehingga dapat menyebabkan kelarutan kolagen (Suptijah *et al.*, 2018; Simamora *et al.*, 2019).

Jika dilihat menurut Gadi *et al.* (2017) dan Astiana *et al.* (2016), mengatakan bahwa perbedaan spesies dan habitat sangat mempengaruhi proses perlakuan awal dan ekstraksi untuk mendapatkan kemurnian yang sesuai standar. Ini dapat dilihat pada ekstraksi ASC

gelembung renang ikan kakap dengan perlakuan awal direndam selama 6 jam menghasilkan rendemen tinggi yaitu 85,3% (Sinthusamran *et al.*, 2013). Nilai tersebut jauh lebih besar dari gelembung renang ikan tuna ekor kuning dengan perlakuan awal direndam selama 2 jam, gelembung renang ikan cunang dengan perlakuan awal 12 jam, kulit ikan hiu dengan perlakuan awal 48 jam, dan tulang ikan cakalang dengan perlakuan awal 72 jam yang menghasilkan rendemen masing-masing adalah 1,07%, 10,29%, 23,07%, dan 16,71% (Kaewdang *et al.*, 2014; Kartika *et al.*, 2016; Slimane dan Sadok, 2018; Ata *et al.*, 2016).

Pada ekstraksi PSC kulit ikan *bighead carp* dengan perlakuan awal direndam selama 36 jam menghasilkan rendemen 60,3% (Liu *et al.*, 2012). Hasil ini terlihat lebih besar dari kulit ikan hiu *blacktip* dengan perendaman selama 6 jam, kulit ikan hiu dengan perendaman 2 hari, gelembung renang ikan tuna ekor kuning dengan perendaman selama 2 jam, dan kulit terluar cumi-cumi dengan perendaman selama 3 hari yang menghasilkan masing-masing rendemen adalah 10,30%, 35,27%, 12,10%, dan 31,16% (Kittiphattanabawon *et al.*, 2010; Slimane dan Sadok, 2018; Kaewdang *et al.*, 2014; Arumugam *et al.*, 2011). Dari hasil ini bisa dikatakan bahwa Jenis ikan memiliki komposisi protein yang berbeda yang dipengaruhi oleh habitatnya. Hal tersebut menyebabkan setiap ikan memiliki kondisi optimal praperlakuan dan hidrolisis yang berbeda-beda (Devi *et al.*, 2017).

- **Rasio Pelarut Asam Asetat dengan Sampel**

Pelarut asam yang digunakan pada ekstraksi ASC, PSC, dan ultrasonik untuk melarutkan kolagen yang tidak berikatan silang maupun yang berikatan silang. Perendaman dalam larutan asam asetat mampu mengembangkan sampel. Pengembangan ini berguna untuk merusak struktur serat kolagen karena terganggunya ikatan non kovalen sehingga melarutkan kolagen pada larutan asam asetat (Astiana *et al.*, 2016). Semakin banyak pelarut yang digunakan maka akan mudah mengeluarkan kolagen pada sampel. Hal ini dikaitkan dengan adanya penetrasi air ke dalam struktur sampel (Wulandari *et al.*, 2015). Jika dilihat pada ekstraksi ASC, PSC, dan *ultrasound* akan memiliki kondisi optimal rasio yang berbeda-beda untuk mendapatkan rendemen. Ekstraksi ASC gelembung renang ikan tuna ekor kuning dengan rasio 1:10 mampu menghasilkan rendemen 1,07% (Kaewdang *et al.*, 2014), sedangkan kulit ikan hiu dengan rasio yang sama menghasilkan lebih banyak rendemen 23,07% (Slimane dan Sadok, 2018). Sebaliknya, dengan rasio 1:15 pada kulit ikan *stripped catfish* dan tulang rawan ikan hiu *blacktip* menghasilkan rendemen 5,1% dan 1,27% (Singh *et al.*, 2011; Kittiphattanabawon *et al.*, 2010). Selain itu, dengan rasio 1:50 pada gelembung renang ikan kakap mampu menghasilkan rendemen sangat tinggi sebesar 85,3%.

Pada ekstraksi PSC sisik ikan *golden goatfish* dengan rasio 1:10 menghasilkan rendemen 1,2% (Matmaroh *et al.*, 2011). Untuk kulit ikan hiu dengan rasio yang sama menghasilkan lebih banyak rendemen 35,27% (Slimane dan Sadok, 2018). Sedangkan, dengan rasio 1:15 pada tulang rawan ikan hiu *blacktip* dan *body wall* bulu seribu mampu menghasilkan rendemen 10,30% dan 2,29% (Kittiphattanabawon *et al.*, 2010; Tan *et al.*, 2013). Namun, pada kulit ikan *bighead carp* dengan rasio 1:40 mampu menghasilkan rendemen yang tinggi sebesar 60,3% (Liu *et al.*, 2012). Sementara itu, pada ekstraksi kolagen dengan *ultrasound* untuk kulit ikan *sea bass* dengan rasio 1:200 menghasilkan rendemen 45-93% (Kim *et al.*, 2012), kulit ikan *golden carp* dengan rasio 1:15 menghaikkan rendemen 81,53% (Ali *et al.*, 2018), kulit ikan *flatfish* dengan rasio 1:100 menghasilkan rendemen 31,3-46,2% (Jung *et al.*, 2018). Perbedaan asil ini dapat dikatakan bahwa spesies, habitat, dan proses ekstraksi kolagen mampu mempengaruhi hasil rendemen (Gadi *et al.*, 2017).

• **Konsentrasi Ekstraksi Asam**

Umumnya, ekstraksi kolagen secara ASC dan PSC menggunakan konsentrasi 0,5 M (Venkatesan *et al.*, 2017). Pada penelitian yang dilakukan oleh Sahubawa dan Putra, (2011) dan Putra *et al.* (2013), melaporkan bahwa ekstraksi kolagen dari kulit ikan nila dengan perlakuan tiga (3) faktor konsentrasi asam asetat yang terdiri dari 0,25 M; 0,5 M; dan 0,75 M, didapatkan hasil rendemen tertinggi diperoleh pada konsentrasi asam asetat 0,75 M dengan rendemen 5,96%. Sedikit perlakuan berbeda yang dilakukan oleh Wulandari *et al.* (2015), melaporkan bahwa konsentrasi asam asetat yang terdiri dari 0,05 M; 0,1 M; 0,15 M; 0,2 M menunjukkan hasil yang tertinggi pada konsentrasi 0,2 M. Hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi larutan asam asetat yang digunakan maka semakin banyak kolagen yang dihasilkan, sehingga faktor konsentrasi larutan berpengaruh terhadap rendemen kolagen. Hal ini disampaikan oleh Romadhon *et al.* (2019) dan Suptijah *et al.* (2018), semakin tinggi konsentrasi larutan makin banyaknya jumlah air yang dapat diserap. Sehingga, serat kolagen menjadi lebih mudah untuk dipisahkan.

Sedikit berbeda dengan ekstraksi kolagen dengan tambahan perlakuan *ultrasound* yang mampu memiliki rendemen tinggi meskipun dengan konsentrasi yang rendah. Dapat dilihat pada Kim *et al.* (2013), menggunakan konsentrasi asam asetat 0,01 M-0,1 M menghasilkan rendemen sekitar 12,91-90,40%. Sedangkan, menurut Jung *et al.* (2018), menggunakan konsentrasi asam asetat 0,05 M menghasilkan rendemen 31,3-46,2%

• **Durasi Ekstraksi Kolagen**

Secara umum, baik ASC dan PSC untuk waktu ekstraksi kolagen yang digunakan dalam perendaman larutan adalah 24-72 jam (Schmidt *et al.*, 2018). Jika dilihat dari penelitian

sebelumnya, ekstraksi ASC yang dilakukan selama 24 jam pada kulit ikan nila sebesar 27,2% (Chen *et al.*, 2013). Hasil ini jauh lebih kecil dari Sinthusamran *et al.* (2013), yang dilakukan selama 48 jam pada gelembung renang ikan kakap yaitu sebesar 85,3%. Namun, hasilnya lebih besar dari sisik ikan *spotted golden goatfish* sebesar 0,46% (Matmaroh *et al.*, 2011), gelembung renang ikan tuna ekor kuning sebesar 1,07% (Kaewdang *et al.*, 2014), dan kulit ikan parang-parang sebesar 2,61% (Safithri *et al.*, 2019). Jika dari ekstraksi ASC selama 72 jam pada kulit ikan hiu sebesar 23,07%, tulang dan kulit ikan cakalang sebesar 14,48-16,71%. Hasil ini jauh lebih kecil dari gelembung renang ikan kakap dan kulit ikan nila (Slimane dan Sadok, 2018; Ata *et al.*, 2016).

Pada ekstraksi PSC yang dilakukan selama 24 jam pada kulit ikan *striped catfish* sebesar 7,7% (Singh *et al.*, 2011). Hasil ini sedikit lebih kecil dari tulang rawan kulit ikan hiu *brownbanded bamboo shark* dan *black tip* sebesar 9,59-10,30% (Kittiphattanabawon *et al.*, 2010) dan lebih besar dari sisik ikan *spotted golden goatfish* sebesar 2,94% (Matmaroh *et al.*, 2011). Namun, jauh lebih kecil dari kulit kerluar cumi-cumi sebesar 31,16% (Arumugam *et al.*, 2011). Sebaliknya, jika dilihat dari ekstraksi PSC selama 72 jam pada kulit dan gelembung renang ikan *bighead carp* sebesar 59-60,3%, yang memiliki nilai lebih besar dari lainnya (Liu *et al.*, 2012).

Proses ekstraksi yang direndam semakin lama biasanya menghasilkan kolagen yang lebih banyak. Menurut Gadi *et al.* (2017), melaporkan bahwa durasi perendaman asam asetat selama 72 jam menghasilkan reaksi yang berbeda nyata dengan perendaman 24 dan 48 jam. Hal ini menunjukkan bahwa seiring bertambahnya waktu ekstraksi maka rendemen kolagen semakin meningkat. Hasil ini sesuai dengan Astiana *et al.* (2016), yang mengatakan bahwa semakin tinggi waktu perendaman maka serat kolagen menjadi lebih mudah untuk dipisahkan dan memudahkan proses ekstraksi. Sebaliknya, pada penelitian yang dilakukan oleh Sahubawa dan Putra, (2011), melaporkan hasil rendemen kolagen tertinggi pada kolagen kulit ikan nila terletak pada lama ekstraksi 16 jam, sedangkan pada lama waktu ekstraksi 48 jam lebih kecil. Pada penelitian tersebut pengaruh lama ekstraksi kolagen tidak memberikan hasil yang signifikan dalam perolehan ekstrak kolagen. Dengan demikian, dapat dikatakan bahwa perbedaan spesies dan habitat akan sangat mempengaruhi proses perlakuan awal dan ekstraksi yang dihasilkan (Gadi *et al.*, 2017).

Hasil yang sedikit berbeda dengan perlakuan ekstraksi kolagen *ultrasound* yang mampu menghasilkan rendemen tinggi dalam waktu yang singkat. Seperti pada penelitian Jung *et al.* (2018), menghasilkan rendemen sekitar 31,3-46,2% dalam waktu ekstraksi 1,5-3 jam. Pada waktu ekstraksi yang lebih lama dapat menghasilkan rendemen yang lebih tinggi lagi. Seperti

yang dilakukan oleh Kim *et al.* (2012), melaporkan bahwa kolagen dari kulit ikan sea bass dengan lama waktu ekstraksi 24 jam menghasilkan rendemen 45-93%. Pada penelitian Ali *et al.* (2018), kolagen dari kulit ikan *golden carp* dengan lama waktu ekstraksi 48 jam menghasilkan rendemen 81,53%.

- **Amplitudo**

Pada ekstraksi kolagen dengan perlakuan ultrasonik, rendemen dapat bernilai tinggi bergantung pada amplitudo yang digunakan. Hal ini dapat dilihat dari penelitian dari Kim *et al.* (2012), pada amplitudo 20%, 40%, 60%, dan 80% menghasilkan rendemen masing-masing sebesar 45%, 70%, 85%, dan 93%. Hasil tersebut dapat dikatakan bahwa seiring meningkatnya amplitudo yang digunakan akan meningkatkan hasil rendemen kolagen. Sesuai dengan pernyataan Kim *et al.* (2013), yang mengatakan bahwa semakin tinggi amplitudo maka rendemen semakin tinggi. Hal ini dikaitkan dengan pengaruh kavitasi pada perlakuan ultrasonik.

3.4 Karakteristik Fisiko-Kimia Kolagen

Karakteristik fisika kimia ini menurut Kartika *et al.* (2016), ditujukan untuk mengetahui sifat-sifat fungsional dari ekstrak kolagen. Parameter karakteristik fisika kolagen yang diamati adalah stabilitas termal, suhu denaturasi, kelarutan, serapan FTIR, dan SDS PAGE. Parameter karakteristik kimia kolagen yang diamati adalah komposisi asam amino.

3.4.1 Komposisi asam amino

Analisis asam amino ini berguna untuk mengetahui asam amino yang berperan sebagai penyusun utama dalam ekstrak kolagen. Cara penentuan asam amino menurut Putra *et al.* (2013) dan Sahubawa dan Putra (2011), adalah diawali memotong rantai kolagen menjadi residu asam amino dengan cara menyiapkan sampel 5 gram kolagen, kemudian dimasukkan ke dalam 20 ml HCl 6 N dan dihomogenkan. Homogenat dimasukkan ke dalam autoklaf pada suhu 110°C dan disimpan selama 12 jam sampai terjadi keseimbangan suhu autoklaf dan ruang. Setelah suhu seimbang, homogenat dinetralkan dengan larutan NaOH 6 N dan menambahkan 2,5 ml Pb asetat dan 1 ml asam oksalat, lalu dilakukan penyaringan dengan *rillex* 0,45 µm. Hasil saringan diinjeksikan dengan alat HPLC untuk dilakukan analisa komposisi asam amino. Penentuan asam amino juga bisa mengacu pada Singh *et al.* (2011), Sinthusamran *et al.* (2013), dan Matmaroh *et al.* (2011), yaitu mula-mula sampel kolagen dihidrolisis di bawah tekanan tereduksi dalam asam metanesulphonic 4,0 M yang mengandung 0,2% (v/v) 3-2 (2-aminoetil) indol pada suhu 115°C selama 24 jam. Hidrolisat dinetralkan dengan 3,5 M NaOH dan diencerkan dengan 0,2 M buffer sitrat (pH 2,2). Takaran larutan 0,4

ml diaplikasikan pada penganalisa asam amino (MLC-703; Atto Co., Tokyo, Jepang). Hasil tersebut dinyatakan sebagai residu / 1000 residu.

Analisis asam amino tersusun oleh hidrolisis protein diikuti dengan pemisahan, identifikasi, dan kuantifikasi asam amino menggunakan teknik kromatografi (Felician *et al.*, 2018). Adapun komposisi asam amino salah satu ilustrasi ekstrak kolagen dapat dilihat pada

Tabel 8.

Tabel 8. Komposisi asam amino kolagen dari berbagai sumber

Sumber Kolagen	Asam Amino (per 1000 residu asam amino)					Peneliti
	Glisin	Prolin	Hidroksi prolin	Alanin	Glutamat	
Kulit ikan layar (<i>Istiophorus platypterus</i>)	318* 325**	94* 99**	94* 99**	113* 111**	76* 72**	Tamilmozhi <i>et al.</i> , 2013
Kulit ikan nila (<i>Oreochromis niloticus</i>)	287*	127*	70*	141*	51*	Chen <i>et al.</i> , 2016
Kulit ikan parang-parang (<i>Chirocentrus dorab</i>)	26,69 ^{aa}	12,24 ^{aa}	td	9,51 ^{aa}	11,72 ^{aa}	Safithri <i>et al.</i> , 2019
Kulit ikan kakap (<i>Lates calcarifer</i>)	331*	117*	79*	134*	70*	Sinthusamran <i>et al.</i> , 2013
Kulit ikan <i>Striped cat fish</i> (<i>Pangasionodon hypophthalmus</i>)	309* 317**	120* 126**	86* 91**	116* 114**	80* 77**	Singh <i>et al.</i> , 2011
Kulit ikan <i>Striped cat fish</i> (<i>Pangasionodon hypophthalmus</i>)	243*	106,2*	80,1*	105,8*	103,7*	Vijayan <i>et al.</i> , 2018
Kulit ikan patin (<i>Pangasius sp.</i>)	19,45 ^{aa}	9,95 ^{aa}	td	11,78 ^{aa}	12,17 ^{aa}	Suptijah <i>et al.</i> , 2018
Kulit ikan kakap (<i>Lates calcarifer</i>)	128,94*	83,32**	56,88**	77,08**	74,42**	Jamilah <i>et al.</i> , 2013
Kulit ikan <i>Bonylip barp</i> (<i>Osteochillus vittatus</i>)	165,6**	td	td	75,8** ^a	79,2** ^a	Junianto <i>et al.</i> , 2018
Kulit <i>Bighead carp</i>	341**	92**	73,2**	126**	77,9**	Liu <i>et al.</i> , 2011





(<i>Hypophthalmichthys nobilis</i>)	Sirip ikan	339**	107**	58,8**	122**	77,3**	Liu et al., 2011
(<i>Hypophthalmichthys nobilis</i>)	Tulang Bighead carp	332**	100**	73,8**	120**	78,1**	Liu et al., 2011
(<i>Hypophthalmichthys nobilis</i>)	Gelembung renang Bighead carp	331**	95**	80,5**	123**	77,7**	Liu et al., 2011
(<i>Hypophthalmichthys nobilis</i>)	Gelembung renang ikan kakap (<i>Lates calcarifer</i>)	326*	111*	83*	134*	71*	Sinthusamran et al., 2013
(<i>Thunnus albacares</i>)	Gelembung renang ikan tuna ekor kuning	225*	80*	48*	102*	97*	Kaewdang et al., 2014
(<i>Muraenesox talabon</i>)	Gelembung renang ikan cunang	302**	95**	74**	118**	80**	
(<i>Parupeneus heptacanthus</i>)	Sisik ikan nila	27,06 ^{aa}	11,14 ^{aa}	td	11,75 ^{aa}	td	Kartika et al., 2016
(<i>Oreochromis niloticus</i>)	Sisik ikan gabus	336*	108*	78*	134*	71*	Matmaroh et al., 2011
(<i>Channa striatus</i>)	Sisik ikan Bighead carp	340**	108**	81**	134**	69**	
(<i>Hypophthalmichthys nobilis</i>)	Sisik ikan nila	276*	135*	72*	137*	47*	Chen et al., 2016
(<i>Channa striatus</i>)	Sisik ikan gabus	280*	170*	68*	114*	10*	Pamungkas et al., 2018
(<i>Hypophthalmichthys nobilis</i>)	Sisik ikan Bighead carp	282**	173**	69**	113**	10**	
(<i>Hypophthalmichthys nobilis</i>)	Sisik ikan Bighead carp	350**	100**	56,2**	125**	80,1**	Liu et al., 2011

Tulang rawan ikan <i>brownbanded bamboo (Chiloscyllium punctatum)</i>	317*	109*	94*	104*	78*	Kittiphattanabawon et al., 2010
Tulang rawan ikan hiu <i>blacktip shark (Carcharhinus limbatus)</i>	317**	105*	91*	119*	77*	Kittiphattanabawon et al., 2010
Bulu seribu (<i>Acanthaster planci</i>)	232**	106**	91**	118**	77**	Tan et al., 2013
Starfish (<i>Asterias amurensis</i>)	338**	108**	111**	105**	106**	Tan et al., 2013
Jellyfish (<i>Cyanea nozakii</i>)	308*	97**	61**	107**	83**	Lee et al., 2009
Teripang gama (<i>Stichopus variegatus</i>)	12,63 ^{ta}	6,80 ^{ta}	td	10,61 ^{ta}	12,16 ^{ta}	Safithri et al., 2020
Kulit ikan <i>flatfish (Paralichthys olivaceus)</i> ^u	24,51 ^{ta}	18,80 ^{ta}	12,70 ^{ta}	11,73 ^{ta}	2,91 ^{ta}	Jung et al., 2018
Kulit ikan <i>golden carp (Probarbus jullieni)</i> ^u	325*	117*	77*	121*	70*	Ali et al., 2018
Calf <i>collagen</i> ^k	332**	121**	81**	120**	68**	Duan et al., 2009
Tulang domba	330	121	94	119	75	Ling-ling et al., 2018
	310,17*	114,60*	94,86*	107,52*	86,04*	Ling-ling et al., 2018
	316,69*	119,50*	101,42**	108,99*	84,08**	Ling-ling et al., 2018

Keterangan:

- Td : Tidak diteliti
- a : Dalam persen (%)
- * : Metode ASC
- ** : Metode PSC
- u : Metode ultrasonik
- k : Kolagen mamalia



Pada umumnya kolagen tersusun dari beberapa asam amino seperti glisin, prolin, dan hidroksiprolin. Glisin merupakan asam amino terbesar sebagai penyusun kolagen (Nurhayati dan Peranginangin, 2009). Menurut Putra *et al.* (2013), kolagen didominasi oleh komposisi asam amino glisin, prolin, alanin, hidroksiprolin, dan asam glutamat. Kolagen dengan komposisi tersebut dapat dinyatakan bermutu tinggi karena kolagen ini dapat membentuk struktur heliks yang paling stabil terhadap perubahan pH dan suhu. Selain itu, kolagen memiliki kandungan asam amino metionin, tirosin, dan histidin yang rendah serta tidak mengandung triptofan atau sistein. Komposisi asam amino menurut Junianto *et al.* (2018), dipengaruhi oleh ikatan silang dan stabilitas termal. Komposisi asam amino kolagen antar spesies hasilnya akan berbeda, hal ini dikarenakan perbedaan dalam struktur molekuler.

Berdasarkan pada **Tabel 8**, sudah menunjukkan bahwa sebagian besar ekstrak kolagen baik secara ASC, PSC, dan ultrasonik pada ikan tawar dan laut ataupun hewan invertebrata disusun oleh glisin sebagai asam amino utama. Hasil ini sebagian besar serupa dengan kolagen mamalia yang berasal dari sapi maupun domba. Dengan begitu sesuai dengan pernyataan oleh Liu *et al.* (2011), Tamilmozhi *et al.* (2013), dan Vijayan *et al.* (2018), bahwa umumnya glisin merupakan asam amino yang dominan dan tersedia sebanyak 1/3 dari total residu asam amino dan umumnya terletak disetiap residu ke tiga kecuali pada pertama 10 residu asam amino di C terminus dan terakhir 14 residu asam amino di N terminus. Menurut Kartika *et al.* (2016), menyatakan bahwa kandungan glisin yang tinggi disebabkan ketersediaan glisin sangat penting pada setiap sekuens dasar Gly-X-Y untuk pembentukan 3 rantai a dalam molekul *tropocollagen*, dimana pada posisi X dan Y sebagian besar adalah prolin dan 4-hidroksiprolin.

Komposisi asam amino esensial yang dapat ditemukan dalam kolagen diantaranya adalah isoleusin, leusin, lisin, metionin, fenilalanin, treonin, valin, dan arginin. Sementara itu, keberadaan sistin pada kolagen yang dihasilkan menunjukkan deproteinisasi belum berjalan optimal sehingga memungkinkan adanya keberadaan asam amino sistin (Suptijah *et al.*, 2018). Asam amino hidroksiprolin merupakan asam amino unik yang ditemukan pada kolagen dan bisa dijadikan penentu rendemen dan kemanjuran dalam proses ekstraksi kolagen (Jamilah *et al.*, 2013). Sebagaimana yang sudah diilustrasikan pada **Tabel 8**, yang menunjukkan kemanjuran pada ekstrak kolagen metode PSC dan ultrasonik dengan tambahan pepsin (UPSC).

Jika dilihat dari **Tabel 8**, pernyataan diatas menunjukkan bahwa komposisi asam amino dari metode ASC, PSC, dan ultrasonik khususnya pada sampel yang seragam menunjukkan sedikit perbedaan. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Pamungkas *et al.* (2018) dan

Matmaroh *et al.* (2011), perbedaan ini dikarenakan penghilangan porsi zona telopeptida yang dilakukan oleh enzim seperti pepsin. Ekstrak kolagen yang diambil dari beragam spesies dan berbagai macam jaringan dapat menghasilkan komposisi asam amino yang berbeda satu sama lain (Kartika *et al.*, 2016 dan Liu *et al.*, 2012). Sebagai tambahan, perbedaan yang terjadi antara komposisi asam amino satu sama lain adalah antara sumber terdapat perbedaan pada beberapa struktur dan kimia, penerapan perlakuan metode ekstraksi yang berbeda, dan perbedaan analisis biokimia yang meskipun dengan spesies sama dapat mempengaruhi perbedaan kandungan asam amino (Felician *et al.*, 2018).

Pada kolagen, kandungan asam imino terdiri dari prolin dan hidroksiprolin, dimana kandungan asam imino ini berperan penting untuk struktur integritas dan berkontribusi dalam stabilitas struktur heliks kolagen. Hal ini disebabkan karena asam imino berguna dalam pembentukan ikatan hidrogen intramolekuler (Pamungkas *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2012). Cincin pirolidin dari prolin dan hidroksiprolin akan memberlakukan pembatasan pada perubahan struktur rantai sekunder polipeptida, dan karenanya membantu mempertahankan struktur *triple helix* (Liu *et al.*, 2012)

Menurut pamungkas *et al.* (2018), menyatakan bahwa kandungan asam imino sisik ikan gabus pada asam (238 residu/1000 residu) lebih rendah dari enzim (242 residu/1000 residu). Begitu pula dengan Singh *et al.* (2011), Matmaroh *et al.* (2011), Kaewdang *et al.* (2013), Tamilmozhi *et al.* (2013), Kittiphattanabawon *et al.* (2010), dan Ali *et al.* (2018), melaporkan bahwa asam imino tertinggi pada ekstrak kolagen enzim baik dengan metode konvensional dan ultrasonik. Kandungan asam imino dari asam yang dinyatakan lebih rendah dari enzim mencerminkan beragam variasi kekuatan dari heliks dan perbedaan dari ikatan silang masing-masing hasil ekstrak kolagen (Kaewdang *et al.*, 2013). Hal ini juga bisa disebabkan karena telopeptida dipecah oleh pepsin, sehingga ekstrak enzim memiliki proporsi asam imino yang lebih besar (Singh *et al.*, 2011).

Keberadaan asam imino ini dikaitkan dengan habitat masing-masing spesies. Dapat dilihat **Tabel 8**. Pamungkas *et al.* (2018), bahwa pada sisik ikan gabus memiliki asam imino tertinggi dari beberapa jenis ikan tawar, laut, invertebrata, dan kolagen mamalia baik dengan metode konvensional dan ultrasonik, yaitu 238-242/1000 total residu. Hal ini bisa disebabkan karena kolagen dari masing-masing spesies dipengaruhi oleh lingkungan hidup spesies tersebut terutama berhubungan dengan suhu air sebagai habitatnya. Kolagen dari ikan yang hidup di perairan hangat (*warm-water fish*), mempunyai kandungan asam imino yang lebih tinggi daripada ikan yang hidup di perairan dingin (*cold-water fish*). Hal ini diketahui bahwa ikan gabus hidup di air tawar pada perairan tropis.

3.4.2 Stabilitas Termal

Salah satu sifat penting lain dari kolagen adalah stabilitas termal. Metode yang digunakan adalah *Differential Scanning Calorimetry* (DSC) dilakukan dengan mengukur perbedaan aliran panas pada sampel dan standar (Suptijah *et al.*, 2018). Penentuan analisis stabilitas termal mengacu pada Singh *et al.* (2011) dengan sedikit modifikasi. Sampel direhidrasi dengan menambahkan deionisasi air (air destilasi) atau asam asetat 0,05 M untuk sampel kering dengan rasio larutan/padat 1:40 (b/v). Campuran dibiarkan selama 2 hari pada suhu 4°C. DSC dilakukan dengan menggunakan kalorimeter pemindaian diferensial (Perkin Elmer, Model DSC7, Norwalk, CA, USA). Kalibrasi suhu yang dijalankan menggunakan standar Indium. Sampel ditimbang secara akurat ke dalam panci aluminium dan disegel. Sampel discan pada 1° C / menit pada rentang 20-50°C dan menggunakan air es sebagai media pendingin. Panci kosong digunakan sebagai referensi atau kontrol. Total denaturation entalpi (DH) diperkirakan dengan mengukur luas termogram DSC. Suhu transisi maksimum (Tmax) diperkirakan dari termogram.

Analisis termal digunakan untuk memahami sifat termodinamis material, sehingga diketahui sifat material dibawah pengaruh pemanasan atau pendinginan, di bawah atmosfer reduksi atau oksidasi dan di bawah tekanan gas. Stabilitas termal ini berkaitan dengan suhu denaturasi kolagen. Denaturasi merupakan sebagai perubahan atau modifikasi struktur sekunder, tersier, dan kuaterner molekul protein, tanpa diikuti dengan pelepasan ikatan kovalen (Putra *et al.*, 2013). Suhu denaturasi kolagen menandakan bahwa jika kolagen dapat bertahan pada suhu tertentu saja, biasanya molekul yang memiliki stabilitas termal yang tinggi dapat resisten terhadap perubahan temperatur tinggi

Pada umumnya, kolagen ikan memiliki suhu denaturasi yang lebih rendah dari kolagen mamalia (Nurhayati dan Peranginangin, 2009). Titik suhu denaturasi kolagen menunjukkan kemampuan stabil terhadap panas. Berdasarkan penelitian yang sudah dilakukan sebelumnya, Liu *et al.* (2012), menyatakan ekstrak kolagen metode PSC masing-masing suhu Tmax dari sirip, sisik, kulit, tulang, dan gelembung renang adalah 35,6; 35,2; 35,7; 37,3; 36,4°C. Singh *et al.* (2011), menyatakan ekstrak kolagen metode ASC dan PSC dari kulit ikan *stripped cat fish* sebesar 39,31°C dan 39,66°C. Sinthusamran *et al.* (2013), melaporkan ekstrak kolagen metode ASC dari kulit dan gelembung renang ikan kakap masing-masing sebesar 33,33°C dan 35,02°C. Matmaroh *et al.* (2011), menyatakan bahwa ekstrak kolagen baik ASC dan PSC dari sisik ikan *golden goatfish* memiliki Tmax sebesar 41,58°C dan 41,01°C. Kaewdang *et al.* (2014), menyatakan bahwa ekstrak kolagen dari gelembung renang ikan tuna ekor kuning baik

metode ASC dan PSC memiliki Tmax sebesar 32,97°C dan 33,92°C. Kittiphattanabawon *et al.* (2010), menyatakan bahwa ekstrak kolagen dari ikan hiu BBS metode ASC dan PSC adalah 36,73°C/35,98°C, sedangkan ikan hiu BTS metode ASC dan PSC adalah 36,28°C/34,56°C. Ali *et al.* (2018), menyatakan bahwa ekstrak kolagen dengan ultrasonik baik secara asam dan enzim memiliki Tmax sebesar 36,14°C dan 40,82°C.

Transisi suhu maksimum yang paling tinggi terletak pada kolagen sisik ikan *spotted golden goatfish*. Hasil ini lebih tinggi dari beberapa jenis ikan dan juga sedikit lebih tinggi dari kolagen mamalia dari kulit sapi (Matmaroh *et al.*, 2011). Hal ini dikaitkan dengan keberadaan asam imino (prolin dan hidroksiprolin) yang tinggi yaitu 186-189/1000 total residu asam amino. Tingginya nilai transisi suhu maksimum (Tmax) mengindikasikan bahwa tingginya stabilitas termal (Sinthusamran *et al.*, 2013). Nilai Tmax yang relatif tinggi dari kolagen ikan menunjukkan ketahanan panas yang tinggi dan stabilitas struktural yang besar (Liu *et al.*, 2012). Sementara itu, jika dibandingkan dengan kolagen yang memiliki transisi suhu maksimum paling rendah, yakni kolagen dari gelembung renang ikan tuna ekor kuning, dimana total asam imino pada 128-169/1000 total residu asam amino (Kaewdang *et al.*, 2014). Semakin tinggi nilai asam imino tersebut, maka stabilitas termal mengalami peningkatan. Hal ini disebabkan karena asam imino (pro+hyp) yang diketahui dapat berkontribusi dalam stabilitas termal.

Perbedaan yang terjadi pada transisi termal atau suhu denaturasi pada sumber kolagen ikan yang berbeda dihubungkan dengan spesies, kandungan asam imino, suhu tubuh, temperatur habitat, musim penangkapan, dan umur (Singh *et al.*, 2011; Sinthusamran *et al.*, 2013). Sementara itu, dapat dilihat pada Kittiphattanabawon *et al.* (2010), bahwa terjadi penurunan Tmax pada PSC. Hal ini dikarenakan penurunan berat molekul yang disebabkan oleh pencernaan pepsin.

Tabel 9. Suhu transisi maksimum dari sumber kolagen yang berbeda

Sumber Kolagen	Tmax (°C)				Referensi
	ASC	UASC	PSC	UPSC	
Kulit					
Ikan <i>Striped cat fish</i> (<i>Pangasionodon hypophthalmus</i>)	39,31	-	39,66	-	Singh <i>et al.</i> , 2011
Ikan kakap (<i>Lates calcarifer</i>)	33,33	-	-	-	Sinthusamran <i>et al.</i> , 2013
Ikan <i>Big head carp</i> (<i>Hypophthalmichthys nobils</i>)	-	-	35,7	-	Liu <i>et al.</i> , 2012



Kulit ikan golden carp (<i>Probarbus jullieni</i>)	36,14	-	40,82	-	Ali et al., 2018
Sisik					
Ikan Big head carp (<i>Hypophthalmichthys nobilis</i>)	-	-	35,2	-	Liu et al., 2012
Ikan golden goatfish (<i>Parupeneus heptacanthus</i>)	41,58	-	41,01	-	Matmaroh et al., 2011
Tulang					
Ikan Bonylip barb (<i>Osteochillus vittatus</i>)	-	-	37,3	-	Liu et al., 2012
Sirip					
Ikan Bonylip barb (<i>Osteochillus vittatus</i>)	-	-	35,6	-	Liu et al., 2012
Tulang rawan					
Ikan hiu brownbanded bamboo (<i>Chiloscyllium punctatum</i>)	36,73	-	35,98	-	Kittiphattanabawon et al., 2010
Ikan hiu blacktip shark (<i>Carcharinchus limbatus</i>)	36,28	-	34,56	-	Kittiphattanabawon et al., 2010
Gelembung renang					
Ikan Bonylip barb (<i>Osteochillus vittatus</i>)	-	-	36,4	-	Liu et al., 2012
Ikan kakap (<i>Lates calcarifer</i>)	35,02	-	-	-	Sinthusamran et al., 2013
Ikan tuna ekor kuning (<i>Thunnus albacares</i>)	32,97	-	33,92	-	Kaewdang et al., 2014
Mamalia					
Calf skin	-	-	40,8 ^{td}	-	Sinthusamran et al., 2013

Keterangan:

^{td} : tidak teridentifikasi ekstraksi secara asam atau basa

3.4.3 Kelarutan Kolagen pada Pengaruh pH dan NaCl

Kelarutan kolagen adalah faktor yang paling penting dan indeks yang sangat baik untuk fungsinya karena dapat memberikan informasi berguna tentang potensi pemanfaatan protein dan fungsinya. Kelarutan dipengaruhi oleh komposisi dan urutan asam amino, berat molekul dan konformasi. Kelarutan kolagen juga dipengaruhi oleh faktor lingkungan, seperti pH, kekuatan ionik, jenis pelarut, suhu dan kondisi pemrosesan (Li *et al.*, 2018). Berikut ini kelarutan kolagen yang dipengaruhi oleh pH dan konsentrasi NaCl, untuk cara menentukan kelarutan kolagen yang dipengaruhi oleh pH dan NaCl mengacu pada Singh *et al.*, (2011) dan Chen *et al.*, (2016) yang sedikit dimodifikasi. Pada pengaruh pH, mula-mula sampel kolagen dilarutkan dalam 0,5 M asam asetat pada suhu 4°C selama 12 jam untuk mendapatkan konsentrasi 3 mg/ml. sampel 8 ml dipindahkan ke tabung sentrifus dan pH disesuaikan dengan 6 M NaOH atau 6 M HCl, untuk mendapatkan pH akhir dengan range antara 1-10. Volume larutan ditambahkan hingga mencapai 10 ml dengan air destilasi atau 0,5 M asam asetat yang sebelumnya sudah disesuaikan dengan pH yang sama dengan sampel kolagen. Larutan disentrifus dengan kecepatan 20.000g selama 30 menit pada suhu 4°C. Konsentrasi protein pada *supernant* ditentukan dengan *Bovine Serum Albumine* sebagai standar. Kelarutan relative dihitung dengan membandingkan yang diperoleh pada pH yang memberikan kelarutan tinggi.

Pada pengaruh NaCl, mula-mula sampel kolagen dilarutkan dalam 0,5 M asam asetat pada suhu 4°C selama 12 jam untuk mendapatkan konsentrasi akhir 6 mg/ml. sampel 5 ml dicampur dengan 0,5 M asam asetat yang mengandung variasi NaCl 0%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, dan 6%. Larutan disentrifus dengan kecepatan 20.000g selama 30 menit pada suhu 4°C. Konsentrasi protein pada *supernant* ditentukan dengan *Bovine Serum Albumine* sebagai standar. Kelarutan relative dihitung dengan membandingkan yang control (tanpa NaCl) (Singh *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2016).

Berdasarkan pH, umumnya kolagen larut pada rentang pH asam. Perbedaan metode pengekstrak dapat berpengaruh pada kelarutan masing-masing kolagen. Sebagai tambahan, bahwa PSC dapat larut dengan tinggi disebabkan karena memiliki berat molekul yang rendah, kurangnya ikatan silang akibat pemecahan oleh enzim, dan kurangnya komponen gamma yang diperoleh dari hidrolisis pepsin (Nurhayati dan Peranginangin, 2009; Pamungkas *et al.*, 2018). Menurut Matmaroh *et al.* (2011), bahwa kelarutan maksimum kolagen sisik ikan *spotted golden goat* baik metode ASC dan PSC berada pada pH 2 dan 4. Kaewdang *et al.* (2013), kelarutan maksimum kolagen gelembung renang ikan tuna ekor kuning metode ASC dan PSC berada pada 4 dan 3. Jamilah *et al.* (2013), kelarutan kulit ikan kakap metode PSC dan PaSC maksimum berada pada pH 4 dan 2.

Hasil yang sedikit berbeda dengan Pamungkas *et al.* (2018), kolagen sisik ikan gabus metode ASC dan PSC maksimum larut pada pH 3, menurut Singh *et al.* (2011), baik ASC dan PSC kolagen kulit ikan *striped cat fish* larut maksimum pada pH 2, menurut Chen *et al.* (2016), kolagen kulit dan sisik ikan nila metode ASC maksimum larut pada pH 3. Liu *et al.* (2012), kolagen dari sirip, sisik, kulit, tulang, dan gelembung renang ikan *bighead carp* metode PSC larut maksimum pada pH 6. Perbedaan kelarutan kolagen pada pH maksimum bisa disebabkan oleh adanya perbedaan sifat molekuler dan konformasi pada masing-masing kolagen (Nurhayati dan Peranginangin, 2009; Chen *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2012). Selain itu, ekstraksi dengan enzim dan asam baik dengan atau tanpa *ultrasound* memiliki perbedaan pH optimal untuk kelarutannya. Penghilangan peptida dapat mempengaruhi protonasi dan deprotonasi yang masing-masing diisi gugus amino dan karboksil. Ini dapat menyebabkan penolakan molekul yang dikaitkan dengan perbedaan kelarutan (Kaewdang *et al.*, 2014).

Kelarutan kolagen dapat menurun drastis terutama ketika range pH meningkat menjadi netral dan sedikit basa (Matmaroh *et al.*, 2011; Jamilah *et al.*, 2013). Pengaruh pH terhadap kelarutan dikaitkan dengan titik isoelektrik protein. Ketika pH lebih rendah atau lebih tinggi dari titik isoelektrik, muatan bersih molekul protein lebih besar dan kelarutannya meningkat oleh gaya tolakan antar rantai. Ketika muatan total molekul protein nol, interaksi hidrofobik-hidrofobik meningkat, sehingga menyebabkan presipitasi dan agregasi pada pl. Telah dilaporkan bahwa kolagen memiliki titik isoelektrik mulai dari pH 6 hingga 9 (Singh *et al.*, 2011). Sementara itu, hasil yang cukup berbeda dengan metode ekstraksi dengan perlakuan ultrasonik, dapat dilihat pada Zou *et al.* (2017), melaporkan bahwa kelarutan pH maksimum berada pada pH 3. Selain itu, jika dilihat dari pH 1-10 kelarutan dari UASC yang dibandingkan dengan ASC mayoritas berada diatas 80%. Hal ini bisa disiratkan bahwa UASC memiliki ikatan yang lebih lemah dari ASC sehingga memiliki kelarutan yang tinggi disemua pH.

Kelarutan kolagen juga dapat dinilai melalui tinggi rendahnya pemberian konsentrasi NaCl. Kelarutan kolagen terhadap konsentrasi NaCl yang tinggi dapat mengakibatkan penurunan. Peristiwa ini dikaitkan dengan fenomena *salting out* (Liu *et al.*, 2012). Ini terjadi ketika konsentrasi garam berada pada level yang pasti, dengan meningkatnya konsentrasi garam akan menyebabkan meningkatnya interaksi hidrofobik-hidrofobik diantara rantai-rantai protein dan meningkatkan kompetisi antara air dengan ion garam yang berakibatkan pengendapan protein, alhasil mengurangi kelarutan kolagen (Jamilah *et al.*, 2013). Pada konsentrasi NaCl yang rendah, ion garam berikatan lemah dengan gugus yang bermuatan pada permukaan protein. Fenomena ini menyebabkan kelarutan ASC dan PSC pada pengaruh NaCl menjadi tinggi (Matmaroh *et al.*, 2011).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Pamungkas *et al.* (2018), menyatakan bahwa kelarutan kolagen dari sisik ikan gabus terhadap pengaruh pemberian konsentrasi NaCl menunjukkan hasil yang dapat larut tinggi sampai konsentrasi 3% NaCl. Namun, terjadi penurunan tajam pada konsentrasi 4% NaCl yang disebabkan oleh *salting out* akibat pemberian NaCl yang semakin tinggi. Hasil ini juga diterima pada kolagen dari kulit dan sisik ikan Nila (Chen *et al.*, 2016) serta 5 jaringan berbeda (sisik, kulit, tulang, sirip, dan gelembung renang ikan *Bighead carp*) (Liu *et al.*, 2012), bahwa dapat larut tinggi pada konsentrasi NaCl yang mencapai 3%, namun terjadi penurunan tajam pada konsentrasi di atasnya. Jika melihat ekstraksi kolagen dari ultrasonik seperti yang dilakukan oleh Zou *et al.* (2017), kolagen dari *soft shelled turtle* kelarutan tertinggi terdapat pada konsentrasi NaCl 10 g/L, sedangkan terjadi penurunan tajam pada konsentrasi di atasnya.

Kelarutan kolagen pada konsentrasi NaCl juga dipengaruhi dengan metode ekstrak. Metode ekstrak PSC dapat menghasilkan kelarutan yang lebih tinggi daripada ASC. Perbedaan ini disebabkan pada PSC terjadi hidrolisis parsial pada molekul ikatan silang oleh pepsin, sehingga mengakibatkan adanya perbedaan pada komposisi asam amino dan struktur diantara ASC dan PSC (Singh *et al.*, 2011; Pamungkas *et al.*, 2018), alhasil membuat PSC kurang rentan terhadap *salting out* dibandingkan dengan ASC (Matmaroh *et al.*, 2011). Selain itu, perlakuan ekstrak kolagen dengan asam normalnya mengandung komposisi struktur molekuler kolagen yang utuh dengan kehadirannya ikatan silang intermolekuler. Dengan ini karena ikatan silang yang tinggi mengakibatkan kurang larut pada asam maupun garam.

Hal ini sejalan dengan penelitian Singh *et al.* (2011) dan Matmaroh *et al.* (2011), bahwa kolagen kulit ikan *striped cat fish* dan sisik ikan *golden goat* dengan menggunakan metode PSC untuk secara keseluruhan mendapatkan kelarutan yang lebih tinggi dari ASC. Penurunan mulai terjadi setelah konsentrasi meningkat >3% untuk kulit ikan *striped cat fish* baik ASC dan PSC serta sisik ikan *golden goat* dengan metode PSC. Namun, hasil yang sedikit berbeda pada sisik ikan *golden goat* metode ASC yang mulai menurun drastis pada konsentrasi >2%.

3.4.4 Zeta Potential

Zeta potential adalah indikator utama stabilitas dispersi koloid dan makromolekul dengan potensi zeta tinggi memiliki kecenderungan rendah untuk membentuk agregat. *Zeta potential* dikenal sebagai potensial elektrokinetik yang merupakan perbedaan potensial melintasi batas fase antara padatan dan cairan dan sering digunakan untuk menggambarkan sifat lapisan ganda dari dispersi koloid. (Li *et al.*, 2018). Penentuan karakteristik yang bisa digunakan pada hasil ekstrak kolagen limbah perikanan adalah melalui melihat *zeta potential*. Penentuan *zeta potential* dilakukan sesuai dengan yang dirujuk oleh Chen *et al.* (2016) dan Matmaroh *et al.*

(2011), ekstrak kolagen baik ASC, PSC, dan ultrasonik dilarutkan dalam 0,5 M asam asetat untuk mendapatkan konsentrasi akhir 0,05% (w/v). Sampel diaduk secara terus menerus dengan *magnetic stirrer* selama 6 jam pada suhu 4°C. Masing-masing sampel diambil 20 ml untuk dilakukan penentuan analisis *zeta potential*. Sampel disesuaikan pada pH range (1-10) dengan 1 M asam sitrat atau 1 M KOH. Larutan *zeta potential* disemua pH direkam dan titik isoelektrik dari masing-masing sampel diperkirakan dari pH yang memberikan nilai zero pada *zeta potential*.

Zeta potential kolagen dikatakan bernilai nol (0) ketika muatan positif diimbangi dengan muatan negatifnya. Hal ini menunjukkan bahwa protein telah terjadi tolakan paling kecil diantara molekul, sehingga diperkirakan sebagai titik isoelektrik (pi) masing-masing kolagen (Sinthusamran *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2011). Ketika muatan proteinnya adalah nol (0), maka interaksi antar hidrofobik meningkat. Hasilnya dapat menyebabkan presipitasi dan agregasi protein. Apabila nilai pH tersebut diatas maupun dibawah pH nilai titik isoelektrik (pi), maka tolakan antara rantai protein meningkat. (Chen *et al.*, 2016).

Sejalan dengan penelitian Sinthusamran *et al.* (2013), menyatakan muatan nol kolagen kulit dan gelembung renang ikan kakap dari metode ASC diamati pada pH 6,46 dan 6,64. Chen *et al.* (2016), melaporkan bahwa nilai potensial dan titik isoelektrik (pi) dari kolagen kulit dan sisik ikan nila adalah 6,42 dan 6,82. Ketika melihat dari kolagen tulang domba menurut Lingling *et al.* (2018), melaporkan bahwa titik isoelektriknya berada pada pH 4,95. Sementara itu, jika melihat dari ekstraksi kolagen asam dengan ultrasonik (UASC) dari *soft shelled turtle* oleh Zou *et al.* (2017), melaporkan bahwa nilai pH titik isoelektriknya berada pada 6,95. Perbedaan titik isoelektrik (pi) pada masing-masing kolagen yang berbeda ini disebabkan oleh komposisi atau susunan asam amino dan distribusi residu asam amino, terutama pada sumber yang digunakan (Kaewdang *et al.*, 2011) dan perbedaan ukuran partikel (Zou *et al.*, 2017). Selain itu, bisa dikatakan bahwa kandungan asam pada komposisi asam amino yang lebih tinggi juga menjadi alasan penting penurunan pi pada kolagen (Ling-li *et al.*, 2018).

Perbedaan titik isoelektrik (pi) juga diamati antara metode ASC, PSC, UASC, dan UPSC. Pada metode tersebut memiliki titik isoelektrik yang berbeda. Nilai yang berbeda diantara kedua metode ini terjadi karena adanya perbedaan komposisi residu asam amino, hal ini yang dikaitkan pada pepsin yang mampu membelah zona telopeptida sehingga menyebabkan perbedaan dalam komposisi asam amino dalam rantai. Selain itu, menghasilkan muatan asam amino yang berbeda dalam rantai α dan rantai β , yang diatur oleh protonasi dan deprotonasi pada pH yang diuji (Kaewdang *et al.*, 2014).

Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Singh *et al.* (2011), muatan nol dari kolagen kulit ikan *striped cat fish* dengan metode ASC dan PSC adalah 4,72 dan 5,43. Kaewdang *et al.* (2014), muatan nol dari kolagen gelembung renang ikan tuna ekor kuning untuk ASC dan PSC adalah 6,05 dan 5,93. Matmaroh *et al.* (2011), muatan nol dari kolagen sisik ikan *spotted golden goat* untuk ASC dan PSC adalah 4,96 dan 5,39. Kittiphattanabawon *et al.* (2010), muatan nol dari kolagen tulang rawan ikan hiu BBS dan BTS dengan metode ASC dan PSC adalah 6,53/7,03 dan 6,96/7,26. Sedangkan, pada ekstrak kolagen kulit ikan *golden carp* baik UASC dan UPSC oleh Ali *et al.* (2018), mengatakan bahwa muatan nol (titik isoelektrik) dari kolagen berada pada pH 6,02 dan 6,56. Dapat dikatakan bahwa pada titik isoelektrik kolagen yang dilakukan dengan metode ultrasonik tidak berpengaruh banyak.

3.4.5 Serapan FTIR

Analisis FTIR dilakukan dengan maksud untuk mengetahui bahwa senyawa yang dihasilkan merupakan kolagen berdasarkan gugus-gugus fungsi penyusunnya. Cara menganalisis gugus fungsi kolagen dengan FTIR menurut Safithri *et al.* (2019), adalah dengan menimbang 100 mg KBr dan 2 mg sampel uji lalu dicampurkan. Kedua bahan ditumbuk sampai halus dan tercampur rata dalam mortar. Pengukuran sampel uji dilakukan pada bilangan gelombang antara 4000-500 cm^{-1} . Spectrum FTIR yang dihasilkan menunjukkan puncak-puncak serapan bilangan gelombang dari sampel uji. Gugus fungsi sampel uji ditentukan berdasarkan puncak serapan bilangan gelombang yang terdeteksi dengan wilayah serapan untuk gugus fungsi protein. Gugus fungsi khas yang ditemukan pada kolagen berdasarkan struktur penyusun kolagen adalah berada pada puncak serapan amida A, amida B, amida I, amida II, dan amida III.

Pada umumnya menurut Suptijah *et al.* (2018), puncak serapan gelombang amida A sekitar 3400-3440 cm^{-1} yang menunjukkan adanya vibrasi NH *stretching*. Hal ini terdeteksi pada kolagen yang berasal dari teripang gama (Safithri *et al.*, 2020) dan *jellyfish* (Zhang *et al.*, 2014). Ketika gugus NH pada peptida dipengaruhi oleh ikatan hidrogen maka posisinya akan bergeser ke frekuensi yang lebih rendah. Seperti yang didapatkan pada kolagen yang berasal dari sisik ikan gabus (Pamungkas *et al.*, 2018), bulu seribu (Tan *et al.*, 2013), kulit dan gelembung renang ikan kakap (Sinthusamran *et al.*, 2013), lima jaringan (sirip, sisik, kulit, tulang, dan gelembung renang) ikan *bighead carp* (Liu *et al.*, 2012), sisik dan kulit ikan nila (Chen *et al.*, 2016), serta tulang rawan dari ikan hiu BBS dan BTS (Kittiphattanabawon *et al.*, 2010). Hal ini menandakan adanya keterlibatan dalam ikatan hidrogen pada kelompok NH yang mampu menstabilkan struktur *triple helix* kolagen (Tan *et al.*, 2013). Sementara itu, pada kolagen asam dan enzim dengan ultrasonik dari kulit ikan *golden carp* mendapatkan nilai

serapan amida A yang tidak jauh berbeda dengan metode konvensional yaitu berupa pada frekuensi yang rendah akibat dipengaruhi oleh ikatan hidrogen (Ali *et al.*, 2018).

Serapan gelombang pada amida B menurut Suptijah *et al.* (2018), sekitar 2915-2935 cm^{-1} , yang menyatakan serapan gelombang amida B terbentuk dari asimetrik CH_2 *stretching*. Hal ini terdeteksi pada kolagen yang berasal dari kulit ikan layar (Tamilmozhi *et al.*, 2013), *jellyfish* (Zhang *et al.*, 2014), kulit dan gelembung renang (Sinthusamran *et al.*, 2013), lima jari lima jaringan (sirip, sisik, kulit, tulang, dan gelembung renang) ikan *bighead carp* (Liu *et al.*, 2012), sisik dan kulit ikan nila (Chen *et al.*, 2016), tulang rawan dari ikan hiu BBS dan BTS (Kittiphattanabawon *et al.*, 2010), teripang gama (Safithri *et al.*, 2020), dan kolagen asam dan enzim dengan ultrasonik dari kulit ikan *golden carp* (Ali *et al.*, 2018).

Selain itu, diketahui bahwa amida I, amida II, dan amida III bertanggung jawab dalam tingkat tatanan molekul yang ada dalam kolagen dan terlibat dalam pembentukan struktur *triple helix* yang ditunjukkan dari $\text{C}=\text{O}$ *stretching*, $\text{N}-\text{H}$ *bending*, dan $\text{C}-\text{H}$ *stretching* (Chen *et al.*, 2016). Menurut Suptijah *et al.* (2018), amida I terletak pada gelombang 1600 cm^{-1} -1690 cm^{-1} , amida II berkisar diantara gelombang 1480 cm^{-1} -1575 cm^{-1} , dan amida III berkisar diantara gelombang 1229 cm^{-1} -1301 cm^{-1} . Penurunan tatanan molekul terjadi jika ikatan hidrogennya tinggi, hal ini dapat dilihat pada gelombang amida I dan amida II yang berada pada frekuensi yang rendah dan juga ikatan amida A yang rendah (Sinthusamran *et al.*, 2013). Pernyataan ini sejalan dengan hasil dari Chen *et al.* (2016), yang menyatakan bahwa ikatan hidrogen dari kolagen sisik ikan nila lebih tinggi dari kulit, yang ditandai dengan frekuensi sisik ikan nila amida I (1651,03 cm^{-1}), amida II (1551,91 cm^{-1}), dan amida A (3318,24) yang lebih rendah dari frekuensi kulit ikan nila amida I (1652,22 cm^{-1}), amida II (1554,92 cm^{-1}), dan amida A (3321,55 cm^{-1}). Dengan meningkatnya ikatan hidrogen maka tatanan struktur kolagen semakin tinggi (Matmaroh *et al.*, 2011).

Perbedaan spektrum FTIR juga dapat ditemukan pada metode yang berbeda, yakni ASC, PSC, UASC, dan UPSC. Pada kolagen larut asam proporsi ikatan hidrogen jauh lebih kecil dari kolagen larut enzim (Pamungkas *et al.*, 2018). Hasil ini sesuai dengan yang dilakukan oleh Matmaroh *et al.* (2011), bahwa kolagen larut enzim dari sisik ikan *spotted golden goat* menunjukkan jika amida I (1631 cm^{-1}) dan amida II (1536 cm^{-1}) berada pada gelombang yang lebih rendah dari kolagen larut asam baik amida I (1646 cm^{-1}) dan amida II (1549 cm^{-1}). Hal ini juga terjadi pada penelitian Kittiphattanabawon *et al.* (2010), menunjukkan bahwa kolagen larut enzim pada ikan hiu BBS amida I (1633 cm^{-1}) lebih rendah dari amida I ASC (1641 cm^{-1}). Begitu pula dengan kolagen larut enzim dengan ultrasonik menunjukkan jika amida I (1630 cm^{-1}) dan amida II (1538 cm^{-1}) yang berada lebih rendah dari kolagen larut asam dengan ultrasonik amida

I (1636 cm⁻¹) dan amida II (1544 cm⁻¹). Fenomena ini menandakan adanya ikatan hidrogen yang kuat pada kolagen larut enzim. Penyebabnya antara lain adalah pepsin yang mengganggu atau memecah ikatan non heliks dari zona telopeptida yang dapat menyebabkan meningkatnya struktur kolagen. Berdasarkan hal ini, adanya perbedaan serapan disebabkan oleh adanya struktur molekul diantara kolagen (Matmaroh *et al.*, 2011).

3.4.6 SDS-PAGE

Analisis *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) adalah suatu metode cepat untuk mengidentifikasi jenis dan struktur kolagen. Cara menganalisis tipe kolagen dengan *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) mengacu menurut Sahubawa dan Putra (2011) adalah dengan mempersiapkan sampel sebanyak 10 µg kolagen kering yang dilarutkan dalam aquades. Campuran diaduk dengan *magnetic stirrer*. Kolagen yang terlarut dicampur dengan perbandingan 1:1 (v/v) dengan 10% SDS. Campuran gel SDS-PAGE dibuat dengan konsentrasi 8%. Memasukkan gel ke dalam lempeng kaca, sampel beserta *marker* protein yang telah disiapkan diinjeksikan ke dalam sumuran yang tersedia. Sampel dimasukkan sebanyak 10 µl secara perlahan, sedangkan *marker* sebanyak 1 µl. *Marker rainbow* digunakan untuk memperkirakan berat bobot molekul protein. Selanjutnya, elektroforesis dijalankan pada 10-20 mA selama 30-60 menit. Setelah proses elektroforesis, gel diwarnai selama 8 jam Coomassie blue R-250 0,05% (b/v) dalam methanol 15% (v/v) dan asam asetat 5% (v/v), kemudian dihilangkan warnanya dengan methanol 30% (v/v) dan asam asetat 10% (v/v). Bobot molekul protein yang diukur menggunakan prinsip elektroforesis SDS-PAGE yang digunakan untuk memisahkan protein berdasarkan pemisahan komponen atau molekul bermuatan berdasarkan perbedaan tingkat migrasi dan berat molekulnya dalam sebuah medan listrik (Gadi *et al.*, 2017).

Berdasarkan dari penelitian terdahulu, bahwa kolagen dengan metode konvensional dan *ultrasound* yang diperoleh dari ikan maupun non ikan menunjukkan hasil yang cukup beragam. Pada kolagen yang berasal dari ikan seperti hasil penelitian dari Chen *et al.*, (2016), menyatakan bahwa berat molekul kolagen dari sisik dan kulit ikan nila mengandung 2 subunit identik (α_1 dan α_2), untuk berat molekul sisik (α_1 : 132 kDa; α_2 : 121 kDa) dan berat molekul kulit (α_1 : 130 kDa; α_2 : 120 kDa). Intensitas yang dihasilkan adalah dari rantai α_1 dua kali lipat dari α_2 [$(\alpha_1)_2(\alpha_2)$]. Pada penelitian Liu *et al.* (2012), kolagen dari ikan *bighead head carp* baik sirip, sisik, kulit, tulang, dan gelembung renang berat molekul α_1 sekitar 126 kDa dan α_2 sekitar 116 kDa. Menurut Astiana *et al.* (2016), kolagen kulit ikan ekor kuning memiliki berat molekul α_1 sekitar 125 kDa, α_2 sekitar 113 kDa. Kolagen ini juga dapat dinyatakan sebagai kolagen tipe I, yang pada umumnya mengandung 2 sub unit α_1 dan 1 sub unit α_2 .

Hasil ini serupa juga dengan yang didapatkan pada kolagen yang berasal kulit ikan *silvercheeked pufferfish* (Dogdu *et al.*, 2019), gelembung renang ikan tuna ekor kuning (Kaewdang *et al.*, 2014), kulit dan sirip ikan tuna (Hashemi-Jokar dan Salarzadeh, 2014), dan gelembung renang ikan cunang (Gadi *et al.*, 2017) yang memiliki dua rantai alfa ($\alpha 1$ dan $\alpha 2$) yang tergolong kolagen tipe I. Sedikit berbeda yang terdapat pada kolagen tulang rawan dari ikan hiu BBS dan BTS dari penelitian Kittiphattanabawon *et al.* (2010), bahwasannya ditemukan pada keduanya mengandung kolagen tipe I dan II. Kolagen tipe II dikatakan memiliki 3 sub unit $\alpha 1$. Jika melihat dari tipe I kolagen mamalia dari tulang domba secara ASC memiliki berat molekul $\alpha 1$ sekitar 126,87 kDa dan $\alpha 2$ sekitar 110,18 kDa (Ling-ling *et al.*, 2018). Nilai ini cukup berbeda dengan kolagen dari ikan. Hal ini juga sesuai dengan Duan *et al.* (2009), yang melaporkan hasil berbeda antara kolagen kulit sapi dan kolagen ikan *carp*. Perbedaan ini dikarenakan sumber berbeda yang terjadi antara kolagen mamalia dan kolagen akuatik.

Jika melihat dari hasil kolagen dengan ultrasonik tersebut tidak jauh berbeda. Hal ini dapat dilihat pada kolagen dari kulit ikan *flatfish* oleh Jung *et al.* (2018), memiliki berat molekul $\alpha 1$ ($\alpha 3$) sekitar 116 kDa, $\alpha 2$ sekitar 100 kDa. Kolagen ini dinyatakan sebagai kolagen tipe I. Menurut Zou *et al.* (2017), kolagen dari *soft shelled turtle* memiliki berat molekul $\alpha 1$ sekitar 127 kDa dan $\alpha 2$ sekitar 116 kDa. Menurut Kim *et al.* (2012), kolagen dari kulit ikan *sea bass* memiliki berat molekul $\alpha 1$ ($\alpha 3$) sekitar 116 kDa, $\alpha 2$ sekitar 97 kDa. Kolagen ini juga dinyatakan sebagai kolagen tipe I.

Pada berat molekul pada kolagen yang umumnya mengandung 2 subunit identik ($\alpha 1$ dan $\alpha 2$), juga ditemukan rantai β (dimer) dan rantai γ (trimer). Seperti yang didapatkan pada kolagen dari ikan ekor kuning yang memiliki komponen β sekitar 170-181 kDa dan γ sekitar 208 kDa (Astiana *et al.*, 2016), kulit dan gelembung renang ikan kakap (*Lates calcarifer*) memiliki komponen β sekitar 187 kDa (Sinthusamran *et al.*, 2013), gelembung udara *stripped catfish* memiliki komponen β sekitar 198 kDa dan γ lebih dari 198 kDa (Vijayan *et al.*, 2018), gelembung renang ikan tuna sirip kuning memiliki komponen β sekitar 220 kDa dan γ lebih dari 220 kDa (Kaewdang *et al.*, 2014), dan tulang rawan ikan hiu BBS dan BTS memiliki komponen β sekitar 170 kDa dan γ lebih dari 220 kDa (Kittiphattanabawon *et al.*, 2010). Adanya rantai β dan γ pada berat molekul kolagen menandakan adanya ikatan silang intramolekuler dan intermolekuler. Tingginya molekul ikatan silang pada kolagen meningkat dengan bertambahnya umur (Tamilmozhi *et al.*, 2013). Selain itu, secara umum ikatan silang pada ikan yang kelaparan akan lebih tinggi pada ikan yang diberi makanan yang baik (Singh *et al.*, 2011).

Pada kolagen dari non ikan seperti bulu seribu ditemukan jika mengandung kolagen tipe I. Hal ini diketahui bahwa dari berat molekul yang teridentifikasi mengandung 2 subunit identik

($\alpha 1$ dan $\alpha 2$). Untuk $\alpha 1$ dan $\alpha 2$ memiliki berat molekul lebih dari 117 kDa. Selain itu, berat molekulnya juga mengandung rantai β dan γ dengan berat lebih dari 204 kDa (Tan *et al.*, 2013). Hasil ini juga diperoleh pada Lee *et al.*, (2009), melaporkan bintang laut memiliki komponen $\alpha 1$ dengan berat sekitar 100 kDa, $\alpha 2$ sekitar 97,4 kDa, dan β lebih dari 205 kDa. Begitu pula dengan kolagen yang diperoleh *jellyfish* yang sedikit berbeda dengan kolagen tipe I yang dikarenakan berat molekulnya diantara sekitar 116 dan 205 kDa dan dikatakan mengandung 3 sub unit $\alpha 1$. Hal ini diketahui bahwa pada umumnya struktur subunit ($\alpha 1$)₃ terjadi secara luas pada invertebrata (Zhang *et al.*, 2014). Dapat diketahui bahwa perbedaan berat molekul pada kolagen disebabkan karena perbedaan sumber dan struktur utama kolagen (Tan *et al.*, 2013).

Berat molekul pada metode seperti ASC, PSC, UASC, dan UPSC dapat mempengaruhi intensitas dan proporsi rantai. Seperti yang dilakukan oleh Matmaroh *et al.* (2011), menunjukkan bahwa pada metode ASC berat molekul kolagen yang berasal dari sisik ikan *spotted golden goat* ($\alpha 1$: 117 kDa; $\alpha 2$: 108 kDa) lebih tinggi daripada PSC ($\alpha 1$: 114 kDa; $\alpha 2$: 106 kDa). Hal ini disebabkan adanya proporsi ikatan silang inter dan intramolekuler yang lebih tinggi. Namun dengan metode PSC dan UPSC, pepsin yang memecah ikatan peptida atau silang pada zona telopeptida sehingga mengalami penguraian. Dengan begitu, komponen berat molekul seperti β dan γ akan dipecah menjadi komponen α . Hal ini serupa kolagen yang berasal dari kulit ikan *striped catfish* (Singh *et al.*, 2011), gelembung renang ikan tuna ekor kuning (Kaewdang *et al.*, 2014), sisik ikan gabus (Pamungkas *et al.*, 2018), dan kolagen dari kulit ikan *golden carp* dengan ultrasonik (Ali *et al.*, 2018).

3.5 Aplikasi Kolagen

Saat ini kolagen ikan memiliki banyak aplikasi seperti, aplikasi farmasi/biomedis, aplikasi bidang kosmetik, dan aplikasi bidang pangan. Hal ini direkomendasikan terhadap penggunaan kolagen sebagai biomaterial, karena memberikan kekuatan dan stabilitas yang luar biasa. Selain itu, diharapkan dengan mengetahui potensi kolagen ikan ini pada bidang tersebut mampu menggantikan kolagen dari sapi dan babi atau jenis lainnya sebagai sumber alternatif (Raman dan Gopakumar, 2018).

3.5.1 Aplikasi di Bidang Biomedis dan Farmasi

- **Rekayasa Jaringan**

Rekayasa jaringan adalah salah satu komponen utama dari pengobatan regeneratif, yang memanfaatkan biomaterial, sel, dan faktor biokimia yang direkayasa bersama untuk penggantian jaringan. Ada dua strategi rekayasa jaringan yang diketahui. Penggunaan biomaterial saja, yang membantu jaringan / organ meregenerasi sendiri, dan penggunaan

biomaterial dengan sel konduktif dan faktor pertumbuhan untuk mendorong regenerasi jaringan. Kolagen diakui sebagai biomaterial yang cocok untuk rekayasa jaringan karena mempromosikan migrasi seluler, interaksi matriks sel, dan regenerasi jaringan (Felician *et al.*, 2018). Kolagen menunjukkan biokompatibilitas yang sangat baik, antigenisitas yang lemah, tingkat adhesi sel langsung yang tinggi, dan tingkat biodegradabilitas yang tinggi dibandingkan dengan polimer alami lainnya seperti kitin/kitosan, gelatin, albumin, dan polimer sintetik (Raman dan Gopakumar, 2018). Sayangnya, penggunaan kolagen sebagai biomaterial memiliki kelemahan seperti rendahnya tingkat kaku biomekanik dan biodegradasi yang cepat, (Song *et al.*, 2006), serta suhu denaturasi yang rendah (Hoyer *et al.*, 2012; Yamamoto *et al.*, 2015).

Dapat dilihat pada penelitian Song *et al.* (2006), menyatakan bahwa kolagen dari sumber laut seperti *jellyfish* kolagen bisa berpotensi sebagai aplikasi material kolagen *scaffolds* untuk rekayasa jaringan. Hal ini ditandai dengan tidak adanya pengaruh sitotoksik dan memiliki viabilitas yang tinggi dari biomaterial lain serta memiliki respon imun yang sebanding dengan dengan kolagen sapi dan gelatin, namun perlu diberi penambahan EDC/NHS *cross linking* sebesar 30% (JC-EDC-30) untuk meningkatkan biostabilitas dari kolagen *scaffolds* supaya resisten terhadap degradasi enzimatik. Menurut Addad *et al.* (2011), untuk mendapatkan atau menstabilkan kolagen dapat dilakukan dengan cara pemberian EDC.

Dari penelitian Hoyer *et al.* (2012), kolagen dari kulit salmon digunakan dengan hidroksiapatit untuk menghasilkan perancah untuk regenerasi tulang, berdasarkan pada prinsip mineralisasi biomimetik. Perancah berpori dari kolagen salmon mineral disiapkan dengan pengeringan beku dan 1% ikatan silang kimia (EDC). Perancah menunjukkan porositas yang saling berhubungan, cukup stabil di bawah kompresi siklik, dan menunjukkan sifat mekanik yang elastis. Perancah dengan pori-pori yang saling berhubungan memungkinkan sel batang mesenkim manusia untuk melekat dan berkembang biak, memberikan dukungan yang baik untuk diferensiasi osteogenik. Adapun juga dari penelitian Yamamoto *et al.* (2015), menunjukkan bahwa kolagen dari kulit ikan tilapia yang dijadikan sebagai TAC *sponge* dipertimbangkan menjadi *scaffolds* pada pengobatan regeneratif berdasarkan sifat fisik dan kimia, seperti dapat diterima ukuran pori spons TAC untuk pembenihan sel dan proliferasi sel. Pembuatan *scaffolds* ini direkomendasikan dengan konsentrasi 1% larutan tilapia tipe I atelokolagen (TAC).

- **Sistem Penghantaran Obat (*Drug Delivery Systems*)**

Sistem pengiriman obat menurut Felician *et al.* (2018), didefinisikan sebagai sistem yang digunakan sebagai media atau pembawa untuk pemberian agen farmasi kepada pasien untuk

mencapai efek terapeutik. Sepanjang sejarah penelitian kedokteran telah menunjukkan berbagai metode pemberian obat pada manusia dan hewan seperti titrasi dosis, terapi obat individual, pemantauan obat terapeutik, pemberian obat pada tingkat terkontrol, pengiriman lambat, dan pengiriman yang ditargetkan. Dengan demikian semakin banyak ilmu yang menggunakan nanopartikel dan partikel mikro sebagai sistem pengiriman obat akhir-akhir ini. Pertimbangan penggunaan kolagen pada aplikasi ini disebabkan rendahnya toksisitas, rendah imunogenitas, dan antigenitas (Calejo *et al.*, 2012). Sayangnya, pada sistem penghantaran obat saat ini masih terbelang dalam tahap uji *in vitro*, sehingga diperlukan uji lanjut lagi untuk memastikan karakteristiknya.

Berdasarkan penelitian dari Calejo *et al.* (2012), mengeksplorasi penggunaan kolagen laut sebagai sistem pengiriman obat berupa protein mikropartikel dengan menggunakan kolagen *jellyfish* (*Catostylus tagi*). Kolagen ubur-ubur digunakan sebagai matriks polimer untuk membentuk kolagen mikropartikel (CMP) dengan menggunakan metode ekstraksi pelarut emulsifikasi-gelasi-pelarut. Kolagen mikropartikel dibuat dengan rasio 10:1 (kolagen:protein; w/w), protein yang dimaksud adalah lisozim. Hubungan silang tinggi dalam matriks kolagen memerangkap protein terapeutik dan mengontrol pelepasan mereka dari sistem dengan aktivitas biologis yang dipertahankan. Studi *in vitro* kolagen mikropartikel menunjukkan potensi penggunaan kolagen laut dalam produksi mikropartikel untuk pelepasan terkontrol protein terapeutik. Dari penelitian yang dilakukan oleh Veeruraj *et al.* (2012), kesesuaian gel dan film kolagen yang disintesis menggunakan ASC dan PSC dari kulit ikan sidat (*Evenchelys macrura*) yang diuji untuk membawa obat-obatan, seperti ampisilin dan tetrasiklin. Dapat dinyatakan bahwa gel dan film kolagen ini sebagai pembawa yang efisien untuk obat anti-bakteri dan anti-jamur untuk digunakan dalam sistem pengiriman obat.

• **Wound Dressing**

Pengganti kulit yang direkayasa jaringan dapat berfungsi sebagai agen terapi yang menjanjikan dalam menangani kulit yang terluka seperti terbakar dengan menyediakan sel, senyawa dan polimer bioaktif untuk proses penyembuhan luka (*wound healing*) (Venkatesan *et al.*, 2017). Pembalut luka yang berguna untuk penyembuhan didasarkan pada konsep dengan menciptakan lingkungan yang optimal untuk memungkinkan sel epitel bergerak tanpa hambatan untuk perawatan luka (Shen *et al.*, 2008).

Saat ini, dari penelitian Chen *et al.* (2019), menyatakan bahwa kolagen *sponge* dari kulit ikan tilapia baik secara asam maupun enzimatis mampu memiliki bioaktivitas yang signifikan dan dapat mempercepat proses penyembuhan dan efektif yang diaplikasikan ke dalam tikus. Banyak bahan dari organisme laut lain yang menjadi inisiator dalam regenerasi jaringan kulit

yang telah menunjukkan potensi tinggi dalam aplikasi klinis. Pada penelitian dari Shen *et al.* (2008), memaparkan bahwa sebuah film komposit yang terdiri dari salmon DNA dan kolagen salmon yang berasal dari limbah telah menunjukkan khasiat yang luar biasa dalam regenerasi luka. Implantasi film ke dalam luka ketebalan penuh di daerah punggung tikus menghasilkan regenerasi jaringan dengan penampilan morfologis yang mirip dengan jaringan dermis tikus asli. Secara signifikan mampu meningkatkan pembentukan kapiler darah. Keberhasilan dalam aplikasi klinis ini dengan menerapkan formulasi komposit kolagen antara salmon DNA dan kolagen salmon sebesar 1:10. Kelebihan pada aplikasi ini adalah mampu membentuk matriks dari jaringan alami dan berperan dalam penyembuhan luka dan jaringan baru. Sedangkan, kelemahannya adalah membutuhkan biaya dan tingkat kemurnian yang tinggi.

3.5.2 Aplikasi di Bidang Kosmetik

Kolagen yang berasal dari limbah ikan telah terbukti memiliki beberapa bioaktivitas dengan kemungkinan terletak pada aplikasi seperti kosmetik (Coppola *et al.*, 2020). Menurut Felician *et al.* (2018), kolagen adalah salah satu bahan utama dalam banyak formulasi kosmetik termasuk krim dan lotion karena manfaatnya yang signifikan sebagai humektan alami dan pelembab. Penggunaan kolagen dibidang kosmetik ini memiliki keunggulan seperti besarnya kemampuan serapan air daripada kolagen hewan terestrial, tingkat bau yang rendah, biaya rendah dan memperbaiki kekuatan mekanik (Venkatesan *et al.*, 2017; Alves *et al.*, 2017).

Dapat dilihat pada penelitian Alves *et al.* (2017), kolagen yang diekstraksi dari kulit ikan cod dan salmon dikarakterisasi untuk mengevaluasi inklusi sebagai komponen dalam formulasi kosmetik. Ini menunjukkan kapasitas yang baik dalam menahan air. Hal ini menunjukkan harapan sebagai kandidat yang cocok untuk aplikasi pelembab kulit. Selain itu, kemungkinan potensi berupa iritasi kulit dan peradangan yang disebabkan oleh kolagen dievaluasi dengan menggunakan uji in vitro epidermis dan dengan mengukur mediator inflamasi (yaitu, IL-6 dan IL-18) dengan uji ELISA yang tersedia secara komersial. Hasil penelitian telah menunjukkan bahwa kolagen ikan ini tidak memiliki efek iritasi atau inflamasi. Sementara itu, kelemahan yang terdapat pada bidang ini adalah masih dalam tahap uji coba sehingga diperlukan untuk tahapan uji lanjut lagi.

3.5.3 Aplikasi di Bidang Pangan

• Suplemen Kolagen

Karakteristik penyerapan air dari kolagen dan fraksinya telah dikenal sebagai serat nutrisi dan sumber protein yang berharga. Seiring bertambahnya waktu, sintesis kolagen yang ada dalam tubuh manusia mengalami penurunan. Dengan adanya suplemen ini diharapkan bisa tetap menjaga kulit, rambut, dan jaringan tubuh. Kolagen yang dimanfaatkan dalam suplemen

ini bisa dalam bentuk *nutricosmetics* yang ditawarkan dalam bentuk cairan, pil, atau makanan fungsional (Raman dan Gopakumar, 2018). Hal ini serupa dengan studi oleh Felician *et al.* (2018), kolagen bisa dimanfaatkan sebagai suplemen atau makanan untuk memperbaiki kulit yang sudah menua. Berdasarkan penelitian oleh Asserin *et al.* (2015), menunjukkan bahwa suplemen Peptan^F yang mengandung 10 g kolagen ikan mampu untuk meningkatkan kelembaban kulit. Untuk pertama kalinya mampu mencegah dan mengurangi fragmentasi jaringan kulit. Hasil ini menunjukkan bahwa suplemen kolagen dapat meningkatkan struktur kulit dan kesehatan dari dalam.

- **Carriers**

Kolagen dalam bentuk film atau pelapis dapat berfungsi sebagai pembawa zat aktif seperti antioksidan, antimikroba, warna, dan rasa. Kolagen dapat dibentuk menjadi berbagai bentuk sistem pengiriman. Aplikasi kolagen sebagai sistem pengiriman adalah pelet mini dan tablet untuk pengiriman protein (Hasyim *et al.*, 2015). Ini dapat dilihat pada penelitian Slimane dan Sadok (2018), menunjukkan bahwa pada kolagen yang berasal dari ikan bertulang rawan dapat berpotensi sebagai bioaktif film komposit. Bahan ini terdiri dari campuran kolagen dan kitosan dengan rasio 50:50 (50% kolagen, 50% kitosan). Penambahan kitosan 50% ke dalam film kolagen untuk meningkatkan kekompakkan biofilm atau mendapatkan edible film yang dapat memiliki sifat mekanik yang baik, kelarutan yang sesuai, dan aktivitas antioksidan. Berdasarkan sifat anti UVnya, film kolagen-kitosan tersebut dapat digunakan sebagai bahan pelindung untuk mempertahankan atau mengawetkan produk nutrasetikal. Sayangnya, pada kolagen dari limbah ikan maupun non ikan yang dimanfaatkan di bidang pangan masih belum tereksplorasi semua, sehingga terbatas dalam penggunaannya.

3.6 Proyeksi Kedepan

Pada saat ini meninjau kembali untuk harus mengarahkan dalam menilai lebih baik atau menilai kembali alternatif potensial komersial dari kolagen yang dihasilkan dari sumber laut. Kolagen laut atau perikanan dapat menjadi sumber kolagen alternatif yang sebenarnya mengingat risiko penularan yang lebih rendah kepada manusia dari agen penyebab infeksi (Raman dan gopakumar, 2018) dan dianggap kurang terkait dengan masalah budaya dan agama terkait dengan penggunaan produk turunan laut pada manusia. Sebagaimana yang sudah dibahas dalam bagian dari *review* ini. Namun, diketahui kembali bahwasannya kolagen dari perikanan tidak hanya berasal dari limbah seperti yang sudah dijelaskan pada *review* ini. Kolagen dari perikanan menurut Felician *et al.* (2018), dapat diperoleh dari hewan vertebrata dan hewan invertebrata. Hewan vertebrata bisa didapat dari ikan dan hewan mamalia. Sumber

vertebrata yang berasal dari ikan bisa diperoleh dari limbah perikanan seperti sisik (Das *et al.*, 2017), kulit (Singh *et al.*, 2011), tulang (Ata *et al.*, 2016), sirip (Liu *et al.*, 2012), gelembung renang (Sinthusamran *et al.*, 2013), dan tulang rawan (*cartilage*) (Slimande dan Sadok, 2018). Pada hewan invertebrata seperti, sotong, cumi (Arumugam *et al.*, 2011), gurita, anemon laut, udang, bintang laut (Lee *et al.*, 2009), *jellyfish* (Addad *et al.*, 2011; Calejo *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2014), spons laut, bulu babi, bulu seribu (Tan *et al.*, 2013), dan teripang (Safithri *et al.*, 2020).

Mengingat kembali bahwasannya bumi terdiri dari 70% lautan yang dihuni berbagai macam organisme (Felician *et al.*, 2018). Sehingga ke depannya perlu dilakukan eksplorasi kolagen yang berasal dari non limbah pengolahan ikan. Hal ini diharapkan bisa menjadi sumber pengetahuan dan referensi baru serta pertimbangan dari kolagen laut sebagai sumber alternatif dari kolagen komersial yang nantinya dapat dimanfaatkan ke berbagai bidang seperti kolagen komersial dengan melihat sifat fisika, kimia, dan biologis.

Sampai saat ini, pada aplikasi kolagen ikan terbilang masih belum banyak diketahui seluruhnya untuk pemanfaatan pada berbagai bidang seperti *food additive* dan *packaging* (Felician *et al.*, 2018). Maka dari itu, perlu dilakukan eksplorasi perihal pemanfaatan di berbagai bidang dengan maksud untuk mengevaluasi masing-masing karakter kolagen yang diperoleh dari berbagai ikan. Sementara itu, aplikasi kolagen ikan yang sebelumnya masih dalam pengujian secara *in vitro* seperti pada penelitian Calejo *et al.* (2012), Veeruraj *et al.* (2012), Alves *et al.* (2017), dan lain sebagainya. Perlu dilakukan uji ke tahap berikutnya, seperti uji *in vivo* dengan maksud untuk mengetahui bagaimana pengaruh kondisi biologis suatu makhluk hidup ketika ditambahkan dengan kolagen dari perikanan.

4. KESIMPULAN

Kolagen merupakan jaringan ikat matriks ekstraseluler yang ketersediaannya melimpah 30% dari total protein hewan. Limbah hasil perikanan dapat menjadi sumber alternatif produksi kolagen selain kolagen komersial karena keberadaannya yang cukup melimpah dan dengan memanfaatkan hasil ini maka limbah hasil perikanan memiliki nilai tambah yang berekonomis tinggi. Pemanfaatan kolagen dari limbah hasil perikanan diharapkan dapat mengurangi pencemaran lingkungan akibat limbah yang tidak dimanfaatkan.

Ekstraksi kolagen dapat dilakukan dengan tiga (3) cara, yaitu *acid soluble collagen* (ASC), *pepsin soluble collagen* (PSC), dan *ultrasound*. Masing-masing hasil ekstraksi ini akan menghasilkan karakteristik yang berbeda-beda baik dalam hal komposisi asam amino, stabilitas termal, kelarutan kolagen baik pH dan NaCl, *zeta potential*, serapan FTIR, dan SDS-PAGE. Diketahui juga bahwa ekstrak kolagen hasil *ultrasound* baik secara asam dan enzim akan memiliki rendemen dan kelarutan yang lebih tinggi dibandingkan dengan kolagen larut asam dan kolagen larut enzim tanpa *ultrasound*, sehingga bisa dikatakan lebih efektif dan efisien. Dengan melihat bahwa limbah hasil perikanan berpotensi sebagai kolagen, maka diharapkan dapat menjadi sumber alternatif dari kolagen komersial dan dapat diaplikasikannya pada bidang biomedis, farmasi, kosmetik, dan pangan. Selain itu, juga diperlukan untuk eksplorasi kolagen dari non limbah perikanan atau sumber perairan lainnya, sehingga bisa dijadikan sumber referensi baru untuk ke depannya.

DAFTAR PUSTAKA

- Addad, S., J. Y. Exposito, C. Faye, S. Ricard-Blum dan C. Lethias. 2011. Isolation, characterization and biological of evaluation of jellyfish collagen for use in biomedical applications. *Marine Drugs*. **9**(6): 967-983
- Ali, A. M. M., H. Kishimura dan S. Benjakul. 2018. Extraction efficiency and characteristics of acid and pepsin soluble collagens from the skin of golden carp (*Probarbus jullieni*) as affected by ultrasonication. *Process Biochemistry*. **66**: 237-244
- Alves, A. L., A. L. P. Marques, E. Martins, T. H. Silva dan R. L. Reis. 2017. Cosmetic potential of marine fish skin collagen. *Cosmetics*. **4**(39): 1-16
- 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
- Arumugham, M., T. Ajithkumar dan T. Balasubramanian. 2011. Isolation and characterization of type v collagen from outer skin waste of *Loligo uyii*. *Journal of Applied Biological Sciences*. **5**(1): 7-10
- Asserin, J., E. Lati, T. Shioya dan J. Prawitt. The effect of oral collagen peptides supplementation on skin moisture and the dermal collagen network: evidence from an ex vivo model and randomized, placebo-controlled clinical trials. *Journal of Cosmetic Dermatology*. **14**(4): 291-301
- Astiana, I., Nurjanah dan T. Nurhayati. 2016. Karakteristik kolagen larut asam dari kulit ikan ekor kuning. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. **19**(1): 79-83
- Ata, S. T. W., R. Yulianty, F. J. Sami dan N. Ramli. 2016. Isolasi kolagen dari kulit dan tulang ikan cakalang (*Katsuwonus pelamis*). *Journal of Pharmaceutical and Medicinal Sciences*. **1**(1): 27-30
- Berhie, A. dan A. Pandita. 2019. Extraction, characterization and utilization of collagen from fish waste: review. *International Journal of Scientific and Engineering Research*. **10**(7): 1475-1504
- Caldeira, M., C. Barreto, P. Pestana dan M. A. T. Cardoso. 2018. Fish residue valorisation by the production of value-added compounds towards a sustainable zero waste industry; a critical review. *Journal of Scientific and Engineering Reaserch*. **5**(4): 418-447
- Calejo, M. T., A. J. Almeida dan A. I. Fernandes. 2012. Exploring a new jellyfish collagen in the production of microparticles for protein delivery. *Journal of Microencapsulation*. **29**(6): 520-531
- Chen, J., L. Liu, R. Yi, N. Xu, R. Go dan B. Hong. 2016. Extraction and characterization of acid-soluble collagen from scales and skin of tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Food Science and Technology*. **66**: 453-459

- Chen, J., K. Gao, S. Liu, S. Wang, J. Elango, B. Bao, J. Dong, N. Liu dan W. Wu. 2019. Fish collagen surgical compress repairing characteristics on wound healing process in vivo. *17(1)*: 33-44
- Coppola, D., M. Oliviero, G. A. Vitale, C. Lauritno, I. D'Amra, S. Iannace dan D. d. Pascale. 2020. Marine collagen from alternative and sustainable sources: extraction, processing and applications. *Marine Drugs*. **18(4)**: 1-23
- Das, M. P., K. Prasad, J.V. Vijaylakshmi, M. Renuka dan P. R. Suguna. 2017. A study on assessment of propriety of fish scale collagen. *Reasearch Journal of Pharmaceutical, Biological, and Chemical Sciences*. **8(2)** : 2473-2479
- Dave, D., Y. Liu, L. Clark, N. Dave, S. Trenholm dan J. Westcott. 2019. Availability of marine collagen from newfoundland fisheries and aquaculture waste resources. *Bioresource Technology Reports*. **7**:1-8
- Devi, H. L. N. A., P. Suptijah dan M. Nurilmala. 2019. Efektivitas alkali dan asam terhadap mutu kolagen dari kulit ikan patin. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. **20(2)**: 255-265
- Dogdu, S. A., C. Turan dan D. Ayas. 2019. Isolation and characterization of collagen and gelatin from skin of silver cheeeked pufferfish *Lagocephalus sceleratus* for pharmaceutical and biomedical applications. *Natural and Engineering Sciences*. **4(3)**: 308-314
- Duan, R., J. Zhang, X. Du, X. Yao dan K. Konno. 2009. Properties of collagen from skin, scale and bone of carp (*Cyprinus carpio*). *Food Chemistry*. **112**:(702-706)
- Felician, F. F., C. Xia, W. Qi dan H. Xu. 2018. Collagen from marine biological sources and medical applications. *Chemical Biodivers*. **15(5)**: 1-41
- Ferraro, V., B. Gaillard-Martinie, T. Sayd, C. Chambon, M. Anton dan V. Sante-Lhoutellier. 2017. Collagen type I from bovine bone. effect of animal age, bone anatomy and drying methodology on extraction yield, self-assembly, thermal behavior and electrokinetic potential. *International Journal of Biological Macromolecules*. **97**:55-66
- Gadi, D. S., W. Trilaksani dan T. Nurhayati. 2017. Histologi, ekstraksi dan karakterisasi kolagen gelembung renang ikan cunang *Muarenesox talabon*. *Jurnal Ilmu dan Kelautan Tropis*. **9(2)**: 665-683
- Ghali, A. E., V. V. Ramakrishnan, M. S. Brooks, S. M. Budge dan D. Dave. 2013. Fish processing wastes as a potential source of proteins, amino acids, and oils: a critical review. *Jurnal of Microbial & Biochemical Technology*. **5(4)**: 107-129
- Harianti. 2012. Pemanfaatan limbah padat hasil perikanan menjadi produk yang bernilai tambah. *Jurnal Balik Diwa*. **3(2)**: 39-46
- Hasemi-Jokar, S. dan Salarzadeh, A. 2014. Comparison of collagen extracted from the skin and fin of long tail tuna *Thunnus Tonggol*. *International Research journal of Applied and Basic Sciences*. **8(7)**: 904-910

- Hasyim, P., M. Ridzwan, M. S. Bakar, J dan M. Hsyim, D. 2015. Collagen in food and beverage industries. *International Food Reasearch Journal*.
- Hoyer, B., A. Bernhardt, S. Heinemann, I. Stachel, M. Meyer dan M. Gelinsky. 2012. Biomimetically mineralized salmon collagen scaffolds for application in bone tissue engineering. *Biomacromolecules*. **13**(4): 1059-1066
- Jamilah, B. U. M. R. Hartina, D. M. Hashim dan A. Q. Sazili. 2013. Properties of collagen from barramundi (*Lates calcarifer*) skin. *International Food Research Journal*. **20**(2): 835-842
- Junianto, Iskandar dan A. Rizal. 2018. Characteristics of physical-chemical properties of collagen extracted from the skin of bonylip barb fish (*Osteochilus vittatus*). *World Applied Sciences Journal*. **36**(1): 78-84
- Jung, S. K., Y. H. Kim, Y. E. Kim, K-M. Song dan N. H. Lee. 2018. Development of industrial ultrasound system for mass production of collagen and biochemical characteristics of extracted collagen. *Food and Bioproducts Processing*. **110**: 96-103
- Kaewdang, O., S. Benjakul, T. Kaewmanee dan H. Kishimura. 2014. Characteristics of collagens from the swim bladders of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*). *Food Chemistry*. **155**: 264-270
- Kartika, I. W. D., W. Trilaksani dan I. K. M. Adnyane. 2016. Karakterisasi kolagen dari limbah gelembung renang ikan cunang hasil ekstraksi asam dan hidrotermal. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. **19**(3): 222-232
- Kementerian Kelautan dan Perikanan. 2020. Data Statistik Hasil Produksi Perikanan Tahun 2013-2017
- Kittiphattanabawon, P., S. Benjakul, W. Visessanguan dan F. Shahidi. 2010. Isolation and characterization of collagen from cartilages of brownbanded bamboo shark (*Chiloscyllium punctatum*) and blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*). *Food Science and Technology*. **43**: 792-800
- Kim, H. K., Y. H. Kim, H. J. Park dan N. M. Lee. 2013. Application of ultrasonic treatment to extraction of collagen from skins of the sea bass *Lateolabrax japonicus*. *Food Science and Technology*. **79**: 849-856
- Kim, H. K., Y. H. Kim, Y. J. Kim, H. J. Park dan N. H. Lee. 2012. Effects of ultrasonic treatment on collagen extraction from skins of the sea bass *Lateolabrax japonicus*. *Food Science and Technology*. **78**: 485-490
- Lee, K-J., H. Y. Park, Y. K. Kim, J. I. Park dan H. D. Yoon. 2009. Biochemical characterization of collagen from the starfish *Asterias amurensis*. *Journal Korean Soc. Appl. Biol. Chemical*. **52**(3): 221-226
- Li, L-Y., Y-Q Zhao, Y. He, C-F. Chi dan B. Wang. 2018. Physicochemical and antioxidant properties of acid and pepsin soluble collagen from the scales of miuiy croaker (*Miichthys miuiy*). *Marine Drugs*. **16**(10): 394-412

- Ling-ling, G., W. Zhen-yu, L. Zheng, Z. Cai-xia dan Z. De-quan. 2018. The characterization of acid and pepsin soluble collagen from ovine bones (*Ujumuin sheep*). *Journal of Integrative Agriculture*. **17**(3): 704-711.
- Liu, D., L. Liang, J. M. Regenstein dan P. Zhou. 2012. Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from fins, scales, skins, bones and swim bladders of bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*). *Food Chemistry*. **133**: 1441-1448
- Liu, D., G. Wei, T. Li, J. Hua, N. Lu, J. M. Regenstein dan P. Zhou. 2015. Effect of alkaline pretreatments and acid extraction conditions on the acid soluble collagen from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin. *Food Chemistry*. **172**: 836-843
- Matmaroh, K., S. Benjakul, T. Prodpran, A. B. Encarnacion dan H. Kishimura. 2011. Characteristics of acid soluble collagen and pepsin soluble collagen from scale of spotted golden goatfish (*Parupeneus heptacanthus*). *Food Chemistry*. **129**: 1179-1186
- Nurhayati dan R. Peranginangin. 2009. Prospek pemanfaatan limbah perikanan sebagai sumber kolagen. *Squalen*. **4**(3): 83-92
- Pamungkas, B. F., Supriyadi, A. Murdiati dan R. Indrati. 2018. Ekstraksi dan karakterisasi kolagen larut asam dan pepsin dari sisik haruan (*Channa striatus*) kering. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. **21**(3): 513-521
- Putra, A. B. N., L. Sahubawa dan N. Ekantari. 2013. Ekstraksi dan karakterisasi kolagen dari kulit ikan nila hitam (*Oreochromis niloticus*). *JPB Perikanan*. **8**(2): 171-180
- Raman, M. dan K. Gopakumar. 2018. Fish collagen and its applications in food and pharmaceutical industry: a review. *EC Nutrition*. **13**(12): 752-767
- Rodriguez, M. I. A., L. G. R. Barroso dan M. L. Sanchez. 2017. Collagen: a review on its sources and potential cosmetic applicatiton. *Journal of Cosmetic Dermatology*. **17**(1):20-26
- Romadhon, Y. S. Darmanto dan R. A. Kurniasih. 2019. Karakteristik kolagen dari tulang, kulit, dan sisik ikan nila. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. **22**(2): 403-410
- Safithri, M., K. Tarman, P. Suptijah dan N. Widowati. 2019. Karakteristik fisikokimia kolagen larut asam dari kulit ikan parang-parang (*Chirocentrus dorab*). *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. **22**(2): 441-452
- Safithri, M., K. Tarman, P. Suptijah dan S. N. Sagita. 2020. Karakteristik kolagen larut asam teripang gama (*Stichopus variegatus*). *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan*. **23**(1): 1-12
- Sahubawa, L. dan A. B. N. Putra. 2011. Pengaruh konsentrasi asam asetat dan waktu ekstraksi terhadap mutu kolagen limbah kulit ikan nila hitam. *Jurnal Tekno Sains*. **1**(2): 16-25
- Schmidt, M. M., R. C. P. Dornelles, R. O. Mello, E. H. Kubota, M. A. Mazutti, A. P. Kempka dan I. M. Demiate. 2016. Collagen extraction process. *International Food Research Journal*. **23**(3): 913-922

- Shen, X., N. Nagai, M. Murata, D. Nishimura, M. Sugi dan M. Munekata. 2008. Development of salmon milt dna/salmon collagen composite for wound dressing. *J. Mater Scientific: Material Medicine*. **19**(12): 3473-3479
- Silva, T. H., J. M. Silva, A. L. P. Marques, A. Domingues, Y. Bayon dan R. L. Reis. 2014. Marine origin collagens and its potential applications. *Marine Drugs*. **12**(12): 5881-5901
- Simamora, G. R. R., W. Trilaksana dan Uju. 2019. Profiling kolagen gelembung renang ikan patin (*Pangasius* sp.) melalui proses enzimatik. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. **22**(2): 299-310
- Singh, P., S. Benjakul, S. Maqsood dan H. Kishimura. 2011. Isolation and characterisation of collagen extracted from the skin of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Food Chemistry*. **124**: 97-105
- Sinthusamran, S., S. Benjakul dan H. Kishimura. 2013. Comparative study on molecular characteristics of acid soluble collagens from skin and swim bladder of seabass (*Lates calcarifer*). *Food Chemistry*. **138**: 2435-2441
- Slimane, E. B. dan S. Sadok. 2018. Collagen from cartilaginous fish by products for a potential application in bioactive film composite. *Marine Drugs*. **16**(6): 211-229
- Song, E., S. Y. Kim, T. Chun, H-J. Byun dan Y. M. Lee. 2006. Collagen scaffolds derived from a marine source and their biocompatibility. *Biomaterials*. **27**(15): 2951-2961
- Suptijah, P., D. Indriani dan S. E. Wardoyo. Isolasi dan karakterisasi kolagen dari kulit ikan patin (*Pangasius* sp.). *Jurnal Sains Natural Universitas Nusa Bangsa*. **8**(1): 8-23
- Tamilmozhi, S., A. Veeruraj dan M. Arumugam. 2013. Isolation and characterization of acid and pepsin-solubilized collagen from the skin of sailfish (*Istiophorus platypterus*). *Food Research International*. **54**: 1499-1505
- Tan, C. C., A. A. Karim, A. A. Latiff, C. Y. Gan dan F. C. Ghazali. 2013. Extraction and characterization of pepsin-solubilized collagen from the body wall of crown-of-thorns starfish (*Acanthaster planci*). *International Food Research Journal*. **20**(6): 3013-3020
- Vijayan, D. K., P. R. Sreekha, C. S. Tejpal, K. K. Asha, S. Mathew, C. N. Ravishankar dan R. Anandan. 2018. Extraction and characterization of acid soluble collagen (ASC) from airbladder of striped cat fish (*Pangasius hypophthalmus*). *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*. **6**(4): 310-318
- Venkatesan, J., S. Anil, S. K. Kim dan M. S. S. 2017. Marine fish proteins and peptides for cosmeceuticals: A review. *Marine Drugs*. **15**(143): 1-18
- Veeruraj, A., M. Arumuga, T. Ajithkumar dan T. Balasubramanian. 2012. Isolation and characterization of drug delivering potential of type-I collagen from eel fish *Evenchelys macrura*. *J. Mater Sci: Mater Med*. **23**: 1729-1738
- Wulandari, P. Suptijah dan K. Tarman. 2015. Efektivitas *pretreatment* alkali dan hidrolisis asam asetat terhadap karakteristik kolagen dari kulit ikan gabus. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. **18**(3): 287-302

Yamamoto, K., Y. Yoshizawa, K. Yanagiguchi, T. Ikeda, S. Yamada dan Y. Hayashi. 2015. The characterization of fish (tilapia) collagen sponge as a biomaterial. *International Journal of Polymer Science*. 1-5

Yamada, S., K. Yamamoto, T. Ikeda, K. Yanagiguchi dan Y. Hayashi. 2014. Potency of fish collagen as a scaffold for regenerative medicine. *Biomed Reasearch International*. **2014**: 1-8

Zhang, J., R. Duia, L. Huang, Y. Song dan J. M. Regenstein. 2014. Characterization of acid soluble and pepsin solubilized collagen from jellyfish (*Cyanea nozakii* Kishinouye). *Food Chemistry*. **150**: 22-26

Zou, Y., P. Xu, P. Li, P. Cai, M. Zhang, Z. Sun, C. Sun, W. Xu dan D. Wang. 2017. Effect of ultrasound pre-treatment on the characterization and properties of collagen extracted from soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*). *LWT-Food Science and Technology*. **82**: 72-81

