

KOLAGEN GELEMBUNG RENANG IKAN PATIN (*Pangasius sp.*) HASIL EKSTRAKSI ASAM

Gressty Sari Br Sitepu*, Joko Santoso, Wini Trilaksani

Departemen Teknologi Hasil Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan,
Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Darmaga, Jalan Agatis, Bogor 16680 Jawa Barat

Telepon (0251) 8622909-8622906, Faks. (0251) 8622915

*Korespondensi: gresstysarisitepu08@yahoo.com

Diterima: 31 Mei 2019/ Disetujui: 22 Agustus 2019

Cara sitasi: Sitepu GSB, Santoso J, Trilaksani W. 2019. Kolagen gelembung renang ikan patin (*Pangasius sp.*) hasil ekstraksi asam. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 22(2): 327-339.

Abstrak

Gelembung renang ikan patin mengandung protein yang tinggi, oleh karena itu dapat digunakan sebagai bahan baku kolagen. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan karakteristik kimia dari gelembung renang, proses *pretreatment* non-kolagen, ekstraksi kolagen menggunakan asam dan untuk mengevaluasi karakteristik kolagen. Metode penelitian yang dilakukan yaitu *pretreatment* KOH dengan konsentrasi 0,05; 0,1; dan 0,15 selama 12 jam. Proses ekstraksi dilakukan dengan merendam sampel dalam larutan asam asetat dengan konsentrasi 0,25; 0,5 dan 0,75 M (rasio 1:10; b/v) dengan perlakuan waktu ekstraksi selama 24, 48 dan 72 jam pada suhu 4°C. Rancangan percobaan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap faktorial (RALF). Hasil penelitian menunjukkan kandungan protein gelembung renang adalah 85,26% (bk), profil asam amino didominasi oleh tiga asam amino yaitu glisina (56,85 mg/g), prolina (31,03 mg/g), dan alanina (23,85 mg/g). Perlakuan 0,05 M KOH selama 8 jam dipilih sebagai metode *pretreatment* terbaik untuk ekstraksi kolagen. Metode ekstraksi menggunakan 0,50 M asetat selama 48 jam menghasilkan kolagen terbaik yang memiliki struktur *triple helix* dan memiliki Tg 84°C.

Kata kunci : asam amino, FTIR, protein, stabilitas termal

Profiling of Collagens from Swim Bladder of Catfish (*Pangasius sp.*) by Acid Extraction

Abstract

Swim bladders of catfish contain high protein, therefore it is can be used as a raw material for collagen. The study aims to determine the chemical characteristics of swim bladders, the pretreatment of non-collagen, extraction of collagen dissolves acid and to evaluate the characteristics of collagen. The method of this study is KOH pretreatment with a concentration of 0,05; 0,1; and 0,15 for 12 hours. The extraction process is done by soaking the sample in a solution of acetic acid with a concentration of 0,25; 0,5 and 0,75 M (ratio 1:10; b/v) and extraction time for 24; 48; and 72 hours at 4°C. The experimental design used for alkaline and acetic acid pretreatment were factorial completely randomized design. The result showed that the protein content of swim bladder was 85,26% (db), the profile of amino acids were dominated by three amino acids namely glycine (56,85 mg/g), prolyne (31,03 mg/g), and alanyne (23,85 mg/g). Using 0,05 M KOH for 8 h was selected as the best pretreatment method for collagen extraction. Extraction method using 0,50 M acetic for 48 h resulted he best collagen which revealed the existence of a triple helix structure and had Tg 84°C.

Keywords : amino acid, FTIR, protein, thermal transition

PENDAHULUAN

Kolagen adalah protein berbentuk *fibrous* yang terdapat dalam jaringan ikat vertebrata yang memiliki tiga rantai polipeptida membentuk *triple helix* (Walters dan Stegemann 2014; Pal *et al.* 2015) dan merupakan kelompok protein yang tidak larut air. Keberadaan kolagen mencapai 25-30% dari total protein hewani yang banyak terdapat pada gigi, tendon, kulit, kornea mata dan tulang (Potaros *et al.* 2009; Sinthusamran *et al.* 2013). Kandungan kolagen didominasi oleh asam amino glisina, prolina, hidroksiprolina, dan alanina yang berperan dalam pembentukan dan penstabilan struktur *helix* kolagen. Kolagen memiliki kadar, komposisi, serta sifat fisikokimia yang berbeda-beda tergantung pada jaringannya (Hema *et al.* 2013). Kolagen yang teridentifikasi ada tipe I sampai XXI yang memiliki urutan asam amino, struktur, dan fungsi yang berbeda (Liu *et al.* 2012).

Pemanfaatan kolagen cukup luas dan berkembang baik digunakan dibidang medis sebagai implan dan kardiovaskular (Hashim *et al.* 2015), dibidang pangan sebagai enkapsulasi (Gómez-Guillén *et al.* 2011), dan dalam bidang kosmetik digunakan sebagai *antiaging* yaitu *make up* dalam bentuk lotion, gel, krim, serum maupun *powder* (Silva *et al.* 2013).

Sumber bahan baku kolagen yang beredar di pasaran umumnya dari bahan baku tulang dan kulit mamalia seperti sapi dan babi. Penggunaan babi tidak dibenarkan oleh Agama Islam, sementara penggunaan tulang dan kulit sapi tidak dapat diterima oleh Agama Hindu. Bahan baku yang bersumber dari sapi juga menimbulkan adanya kekhawatiran karena isu penyakit sapi gila atau *mad cow disease* (Santos *et al.* 2013). Permasalahan ini memberikan peluang besar pada pemanfaatan hewan akuatik misalnya ikan sebagai sumber bahan baku kolagen.

Ikan patin merupakan salah satu jenis ikan yang saat ini berkembang pesat. Produksi ikan patin di Indonesia meningkat secara signifikan sejak tahun 2004 hingga tahun 2009, yaitu sekitar 30.000-50.000 ton per tahun. Tahun 2016 produksi patin nasional sebesar 437.111 ton, naik signifikan dari tahun sebelumnya yaitu 339.069 ton dan

pada tahun 2018 produksi patin sebanyak 604.587 ton (KKP 2018). Produksi ikan patin selama ini masih sebatas daging (*fillet*) untuk dikonsumsi. Banyaknya produksi dan konsumsi daging tersebut akan menghasilkan jumlah hasil samping yang tinggi. Hasil samping merupakan sisa dari suatu proses produksi berupa tulang, kulit, jeroan dan gelembung renang. Jumlah hasil samping yang didapat pada saat pengolahan ikan berkisar 20-60% dari bahan baku (Kittiphattanabawon *et al.* 2010). Pemanfaatan hasil samping ini akan berdampak positif karena dapat menjadi produk yang bernilai jual, dapat mengurangi dampak negatif terhadap lingkungan serta meningkatkan pendapatan. Salah satu bagian hasil samping ikan patin yang memiliki potensi untuk dimanfaatkan sebagai sumber kolagen adalah bagian organ gelembung renang.

Gelembung renang dikenal sebagai gelembung udara yang digunakan sebagai bahan tambahan makanan dalam sop sayur bagi masyarakat di Cina (Trilaksana *et al.* 2006), bahan baku pembuatan *isinglass* yang dimanfaatkan sebagai penjernih minuman bir di Eropa (Hickman *et al.* 2000). Gelembung renang juga dimanfaatkan sebagai kolagen (Kaewdang *et al.* 2014). Trilaksana *et al.* (2006) telah meneliti pemanfaatan gelembung renang ikan patin *Pangasius hypophthalmus* sebagai bahan baku pembuatan *isinglass* dengan kandungan protein 94,38-94,63%. Kartika *et al.* (2016) meneliti gelembung renang ikan cunang *Muarenesox talabon* sebagai kolagen dengan kandungan protein 93,39%. Kandungan protein yang tinggi diduga berasal dari kandungan protein jaringan ikat yang tidak larut dalam air.

Proses pengolahan gelembung renang menjadi kolagen diawali dengan melakukan atau proses *pretreatment*. *Pretreatment* dilakukan untuk mengeliminasi protein non-kolagen serta menghilangkan lemak dan mineral-mineral dalam jaringan gelembung renang sehingga mempermudah proses ekstraksi. Sinthusamran *et al.* (2013) menjelaskan bahwa proses *pretreatment* protein non kolagen dapat menggunakan larutan alkali atau basa misalnya natrium hidroksida (NaOH) karena mampu melarutkan

komponen-komponen non-kolagen. Kolagen dapat diekstraksi dengan beberapa metode yaitu metode ekstraksi hidrotermal, ekstraksi enzim dan ekstraksi asam, namun sampai saat ini metode yang sering digunakan adalah metode ekstraksi menggunakan asam karena relatif mudah dilakukan, selain itu asam memiliki kemampuan yang tinggi dalam mengekstrak kolagen (Liu *et al.* 2015).

Penelitian-penelitian tentang ekstraksi kolagen larut asam dari hasil samping ikan sudah berkembang dan menghasilkan rendemen yang berbeda-beda. Hasil samping ikan yang sudah banyak dijadikan bahan baku kolagen adalah bagian tulang, kulit dan gelembung renang ikan. Ekstrak kolagen larut asam dari gelembung renang ikan tuna memiliki rendemen 1,07% (Kaewdang *et al.* 2014), kolagen larut asam dari gelembung renang ikan mas *Hypophthalmichthys nobilis* yaitu 14,6% (Liu *et al.* 2012), hasil rendemen ekstrak kolagen larut asam dari kulit ikan nila hitam *Oreochromis niloticus* 5,96% (Putra *et al.* 2013) dan rendemen kolagen larut asam dari kulit ikan patin 17,27% (Devi *et al.* 2017). Wang *et al.* (2014) mengungkapkan bahwa perbedaan rendemen dapat dipengaruhi oleh proses ekstraksi, kondisi ekstraksi dan jenis bahan baku.

Penelitian tentang ekstraksi dan karakterisasi kolagen dari gelembung renang ikan patin belum pernah dilaporkan, sehingga eksplorasi ekstraksi gelembung renang ikan patin menjadi kolagen menggunakan asam diharapkan dapat memberi informasi yang bermanfaat untuk meningkatkan nilai ekonomis hasil samping gelembung renang tersebut. Penelitian ini bertujuan menentukan karakteristik gelembung renang ikan patin dan karakteristik kolagen yang diekstrak menggunakan metode asam.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah gelembung renang ikan patin yang diperoleh dari PT. Kurnia Mitra Makmur. Bahan-bahan kimia yang digunakan dalam proses praekstraksi (*pretreatment*) dan ekstraksi kolagen gelembung renang ikan patin yaitu KOH (Merck), CH₃COOH (Merck),

NaCl (E. Merck) dan akuades. Peralatan yang digunakan yaitu spektrofotometer (SPECTRO UV-VIS), sentrifugasi (HIMAC 21G), freeze dryer (Eyela FDU-1200 Japan), FTIR (Bruker Tensor 37 Germany), *Differential Scanning Calorimetry* (Shimadzu Germany), *Ultra Performance Liquid Chromatography* (Water-Corporation USA), oven (Memmert UNB 400 Germany) dan pH meter (ORION 3 STAR Thermo Scientific Germany).

Metode Penelitian

Penelitian ini terdiri atas dua tahapan, yaitu: (1) preparasi dan karakterisasi kimia bahan baku gelembung renang ikan patin, (2) proses *pretreatment*, ekstraksi dan karakterisasi kolagen larut asam (ASC).

Preparasi dan karakterisasi gelembung renang

Gelembung renang ikan patin dicuci menggunakan akuades kemudian dilakukan pengecilan ukuran untuk mempermudah dalam tahapan *pretreatment* dan ekstraksi, kemudian analisis proksimat dan asam amino (tanpa ulangan).

Proses *pretreatment* dan ekstraksi kolagen gelembung renang

Proses *pretreatment* mengacu pada metode Liu *et al.* (2015) dengan modifikasi. *Pretreatment* dilakukan dengan tujuan untuk menghilangkan komponen nonkolagen, lemak, dan pigmen dari gelembung renang. Gelembung renang berukuran kira-kira 0,5x0,5 cm² direndam dalam larutan KOH dengan rasio sampel : larutan adalah 1:10 (b/v), konsentrasi KOH yaitu 0,05; 0,1; dan 0,15 M. Perendaman sampel dalam larutan KOH suhu 4°C (penyimpanan dalam refrigerator) selama 12 jam dengan pergantian larutan KOH setiap 2 jam. Sampel hasil perendaman KOH dicuci menggunakan akuades hingga pH netral, kemudian pada air sisa rendaman KOH dilakukan uji kandungan protein terlarut untuk mendapatkan perlakuan konsentrasi dan waktu terbaik.

Gelembung renang diekstrak dengan proses ekstraksi asam. Sampel direndam dalam larutan asam asetat dengan konsentrasi 0,25; 0,5 dan 0,75 M rasio 1:10; b/v) pada

suhu 4°C (penyimpanan pada refrigerator) selama 24, 48 dan 72 jam, kemudian dilakukan penyaringan terhadap suspensi hasil ekstraksi. Proses pengendapan terhadap filtrat suspensi menggunakan NaCl (konsentrasi akhir 2,6 M), kemudian dilakukan proses pemisahan menggunakan *sentrifuge* pada suhu 4°C dengan kecepatan 10.000g selama 30 menit. Pelet hasil sentrifugasi didialisis dalam asam asetat 0,5 M rasio 1:1 (b/v) dengan kantong dialisis *cut-off* 12 kDa, kemudian di dialisis ulang menggunakan akuades selama 24 jam. Hasil dialisis di liofilisasi menggunakan pengering beku (*freeze dryer*).

Rendemen kolagen

Rendemen kolagen dapat dihitung menggunakan rumus berikut:

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{\text{Berat kering kolagen}}{\text{Berat bahan baku}} \times 100\%$$

Analisis proksimat (AOAC 2005)

Analisis proksimat meliputi kadar air (925,09); protein (920,87); abu (941,12); lemak (960,39); dan karbohidrat yang dilakukan secara *by difference*.

Pengukuran protein terlarut (Bradford 1976)

Pencampuran larutan Bradford dengan 500 mg CBB dan 25 mL etanol, kemudian penambahan 50 mL larutan asam ortofosfat 85% dan akuades hingga 500 mL, lalu penyaringan larutan Bradford dengan kertas saring Whatman 01 kemudian sebanyak 5 mL larutan Bradford ditambahkan 0,1 mL sampel, lalu dihomogenkan menggunakan vortex sampai homogen. Pengukuran absorbansi sampel menggunakan spektrofotometer UV-2500 (pada $\lambda = 595 \text{ nm}$).

Analisis kandungan asam amino (Nollet 1996)

Asam amino dianalisis menggunakan *ultra performance liquid chromatography* (UPLC). Perangkat UPLC dibilas dengan eluen dan Syringe dibilas dengan akuades. Analisis ini terdiri atas 2 tahapan yaitu pembuatan larutan sampel dan pembuatan larutan standar.

Penentuan derajat pengembangan kolagen

Kolagen kering sebanyak 0,1 g direndam dalam 5 mL akuades, lalu di inkubasi selama 10 menit, lalu disaring dan ditimbang. Nilai derajat pengembangan dihitung menggunakan rumus berikut:

$$\text{Derajat pengembangan (\%)} = \frac{A-B}{B} \times 100\%$$

Keterangan:

A : Berat sampel setelah mengembang
B : Berat sampel kering.

Analisis kelarutan kolagen

Sampel kolagen kering sebanyak 0,1 g dilarutkan dalam 10 mL akuades dan dilakukan pengadukan. Larutan disaring menggunakan kertas saring bebas abu kemudian dioven pada suhu 100°C selama 60 menit lalu nilai kelarutan dihitung dengan rumus Kittiphattanabawon *et al.* (2005):

$$\text{Kelarutan (\%)} = \frac{\text{Berat kolagen tidak terlarut}}{\text{Berat sampel}} \times 100\%$$

Analisis gugus fungsi

Sampel uji sebanyak 2 mg dan campuran KBr.100 dibentuk menjadi pelet, kemudian dihaluskan menggunakan mortar agate. Sampel uji diukur pada bilangan gelombang antara 4000-500 cm^{-1} . Spektra FTIR yang dihasilkan menunjukkan puncak-puncak serapan bilangan gelombang dari sampel uji (Yan *et al.* 2008).

Uji stabilitas termal kolagen menggunakan DSC

Sampel direhidrasi dengan menambahkan air deionisasi rasio 1:40 (b/v) dan disimpan selama 2 hari pada suhu 4°C. Kalibrasi alat DSC dijalankan menggunakan termogram indium. Sampel sebanyak 5 hingga 10 mg ditempatkan dalam wadah aluminium kemudian ditutup. Sampel kemudian dianalisis pada suhu antara 20°C sampai 50°C dengan laju pemanasan 1°C/menit menggunakan air es. Pan kosong digunakan sebagai referensi. Suhu transisi maksimum (T_{max}) diperkirakan

dari termogram dan total entalpi denaturasi (Δ_H) diperkirakan oleh pengukuran area termogram DSC (Rochdi *et al.* 2000).

Analisis Data

Analisis yang digunakan pada proses perhitungan proporsi, analisis proksimat dan asam amino (tanpa ulangan) dilakukan secara deskriptif menggunakan deviasi standar dari tiga kali ulangan yang ditunjukkan dalam hasil berupa tabel dan grafik. Penghilangan protein non-kolagen dan proses ekstraksi menggunakan rancangan acak lengkap factorial (RALF) dengan perangkat lunak SAS dilanjutkan dengan *Least Significant Difference Test* sebagai uji lanjut (Steel dan Torrie 1993).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik Kimia Gelembung Renang Ikan Patin Komposisi kimia

Hasil uji proksimat gelembung renang ikan patin disajikan pada *Table 1*, diketahui bahwa komposisi proksimat hasil samping gelembung renang ikan patin didominasi oleh kadar air yaitu 74,61%. Kadar air gelembung renang ikan patin tersebut lebih rendah dari kadar air gelembung renang ikan patin yang diteliti oleh Riyanto (2006) dan gelembung renang tuna sirip kuning yang diteliti oleh Kaewdang *et al.* (2014), tetapi lebih tinggi dari kandungan air gelembung renang ikan cunang yang diteliti oleh Kartika *et al.* (2016) dan Gadi *et al.* (2017). Holma *et al.* (2013) melaporkan bahwa kadar air pada ikan segar umumnya dapat mencapai 70-84%.

Ayas dan Ozugul (2011) menyatakan nilai kadar air yang berbeda biasanya

disebabkan oleh beberapa faktor, di antaranya perbedaan jenis ikan, umur panen, tingkat kesegaran, serta keadaan lingkungan hidup yang berbeda. Tingginya kadar air pada suatu bahan dipengaruhi oleh sifat bahan yang mampu mengikat air (*water holding capacity*). Chen (2016) menyatakan kandungan air berfungsi sebagai penyeimbang pH, menjaga tekstur dan kelenturan suatu bahan.

Kandungan protein gelembung renang ikan patin menjadi hal yang penting dalam ekstraksi kolagen karena kolagen merupakan produk turunan dari protein. Kadar protein gelembung renang ikan patin ($21,63 \pm 0,18\%$) lebih rendah dari kadar protein ikan cunang (24,74% dan 33,67%) (Kartika *et al.* 2016; Gadi *et al.* 2017), akan tetapi lebih tinggi dari gelembung renang ikan tuna sirip kuning (12,09%) (Kaewdang *et al.* 2014). Kadar protein yang terdapat dalam ikan berkisar 15-25% (Nurjanah dan Abdullah 2010).

Lemak dan abu merupakan komponen yang dapat mengganggu dalam proses ekstraksi kolagen (Shon *et al.* 2011). Kadar lemak gelembung renang ikan patin ($0,55 \pm 0,11\%$) lebih tinggi dari kadar lemak gelembung renang ikan cunang yang diteliti oleh Kartika *et al.* (2016) dan Gadi *et al.* (2017) berturut-turut 0,5% dan 0,31% dan tuna sirip kuning (1,44%) (Kaewdang *et al.* 2014). Kadar abu gelembung renang ikan patin ($0,5 \pm 0,11\%$) lebih tinggi dari kadar lemak gelembung renang ikan cunang yang diteliti oleh Kartika *et al.* (2016) dan Gadi *et al.* (2017) berturut-turut 0,27% dan 0,17% dan tuna sirip kuning 0,29% (Kaewdang *et al.* 2014). Sinthusamran *et al.* (2013) menjelaskan kandungan lemak dapat dihilangkan melalui

Table 1 Proximate content swim bladder of catfish

Parameter	Percentage (%)				
	Research result	<i>Pangasius sp.</i> ¹	<i>C. talabon</i> ²	<i>C. talabon</i> ³	Yellowfin tuna
Moisture	74.61±0.025	78.34	73.88	65	83.33
Protein	21.63±0.180	14.37	24.74	33.67	12.09
Lipid	0.55±0.11	0.03	0.5	0.31	1.44
Ash	0.5±0.11	0.05	0.27	0.17	0.29
Carbohydrate*	2.705±0.015	4.22	1.28	0.85	2.85

Information: ¹Riyanto (2006), ²Kartika *et al.* (2016), ³Gadi *et al.* (2017), ⁴Kaewdang *et al.* (2014),

*calculated by difference.

proses *defatting* menggunakan larutan alkali atau basa seperti natrium hidroksida (NaOH).

Komposisi Asam Amino

Kolagen merupakan protein yang memiliki bentuk seperti serabut (fibrin) yang terdiri atas beberapa asam amino (Bae *et al.* 2008). Asam amino utama dalam pembentuk kolagen adalah alanina, glisina, prolina, dan hidroksiprolina (Bae *et al.* 2008). Kandungan protein gelembung renang ikan patin terdiri atas 15 jenis asam amino yang disajikan pada *Figure 1*. Kandungan asam amino gelembung renang ikan patin didominasi oleh asam amino penyusun utama kolagen yaitu glisina (56,85 mg/g), prolina (31,03 mg/g), dan alanina (23,85 mg/g).

Glisina adalah asam amino yang memiliki kadar paling tinggi dibandingkan asam amino lainnya yang terdapat pada gelembung renang ikan patin. Bae *et al.* (2008) melaporkan bahwa asam amino glisina memiliki fungsi untuk membentuk rantai *triple heliks* pada kolagen. Kittiphattanabawon *et al.* (2005) mengungkapkan bahwa keberadaan glisina dalam pembentuk kolagen mencapai 30% dari total asam amino.

Asam amino prolina merupakan asam amino pembentuk kolagen yang tertinggi kedua setelah asam amino glisina. Ngili (2009) menyatakan bahwa asam amino prolina merupakan kelompok nonpolar memiliki struktur alifatik heterosiklik yang berbeda dari

asam amino lainnya karena merupakan suatu asam imino yang memiliki gugusan imino (=NH) daripada gugusan amino (-NH₂) sehingga dapat berfungsi sebagai titik belok bagi β -sheets dan sebagai pengubah struktur α -helix. Tamilmozhi *et al.* (2013) melaporkan bahwa asam amino prolina dan hidroksiprolina adalah jenis asam amino bersifat unik karena memiliki cincin pirolidina sehingga disebut dengan *imino acid*. Kedua jenis asam amino ini memiliki peran dalam mempertahankan struktur superheliks pada kolagen. Huang *et al.* (2011) melaporkan bahwa keberadaan cincin pirolidina yang dimiliki oleh asam amino prolina dan hidroksiprolina berfungsi untuk memperkuat kestabilan suhu pada struktur *triple helix* kolagen.

Asam amino utama pembentuk kolagen selain glisina dan prolina adalah alanina. Alanin merupakan asam amino nonpolar dengan gugus R alifatik sama seperti pada asam amino glisin. Alanina memiliki fungsi yang sama seperti glisina yakni membentuk tiga rantai alfa heliks (Mahan dan Stump 2008).

Konsentrasi Protein Terlarut Hasil Perendaman Gelembung Renang Ikan Patin pada Larutan KOH

Proses *pretreatment* merupakan tahapan untuk mengeliminasi komponen non-kolagen, lemak, dan pengotor lainnya sehingga protein kolagen mudah larut pada

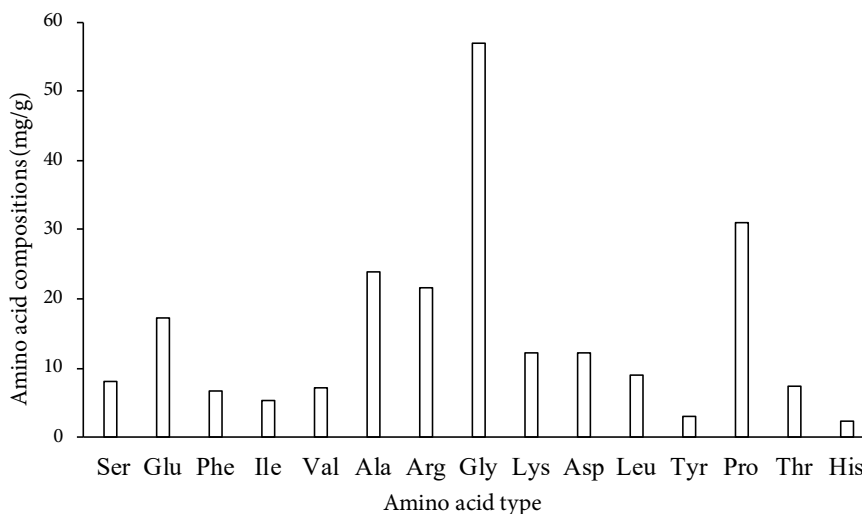


Figure 1 Amino acid composition swim bladder of *Pangasius* sp.

saat proses ekstraksi. Ramachandran dan Reddi (2013) menyatakan bahwa larutan basa memiliki kemampuan memecah sebagian besar daerah telopeptida molekul kolagen yang menyebabkan terjadinya *swelling* pada gelembung renang sehingga protein non-kolagen yang terdapat dalam matriks kolagen akan mudah terlarutkan. Larutan basa yang biasa digunakan yaitu NaOH karena memiliki kemampuan yang baik untuk menghilangkan protein nonkolagen, namun pada penelitian ini menggunakan larutan basa KOH yang memiliki sifat yang sama dengan NaOH yaitu termasuk kedalam golongan basa kuat sehingga KOH diduga memiliki kemampuan yang sama dengan NaOH dalam menghilangkan protein nonkolagen selama proses *pretreatment*. Hasil analisis protein terlarut perendaman gelembung renang ikan patin pada larutan KOH setiap dua jam sekali disajikan pada *Figure 2*.

Kandungan protein terlarut pada larutan KOH sisa perendaman gelembung renang ikan patin perendaman 2 jam pertama mengindikasikan tingginya kadar protein non-kolagen dan meningkat pada 4 jam berikutnya, namun pada perendaman 6 jam dan 8 jam kandungan protein nonkolagen terlarut sisa perendaman gelembung renang menurun, yang diduga protein non-kolagen sudah habis terlarut namun pada perendaman

10 jam dan 12 jam kandungan protein terlarut kembali meningkat. Kandungan protein yang meningkat disebabkan karena protein kolagen sudah mulai terlarut dalam larutan KOH.

Kandungan protein terlarut dari larutan KOH sisa perendaman gelembung renang ikan patin menunjukkan bahwa konsentrasi KOH, lama perendaman, serta interaksi konsentrasi KOH dan waktu perendaman berpengaruh nyata terhadap kandungan protein terlarut pada larutan KOH. Hasil uji lanjut menunjukkan bahwa perlakuan terbaik pada proses *pretreatment* (penghilangan protein non-kolagen) adalah pada perlakuan konsentrasi larutan KOH 0,05 M dengan lamaperendaman 8 jam. Liu *et al.* (2015) mengemukakan bahwa penggunaan NaOH dengan konsentrasi 0,05 M dan 0,1 M dapat melarutkan protein non kolagen tanpa menyebabkan kehilangan kolagen, sedangkan penggunaan NaOH diatas 0,1 M secara signifikan menyebabkan kehilangan kolagen.

Ekstrak Kolagen Larut Asam Gelembung Renang Ikan Patin

Proses ekstraksi gelembung renang ikan patin dilakukan menggunakan asam asetat. Proses ekstraksi diawali dengan penetralan sampel gelembung renang hasil perendaman dengan KOH dengan perlakuan terpilih. Perendaman dalam asam dapat menyebabkan

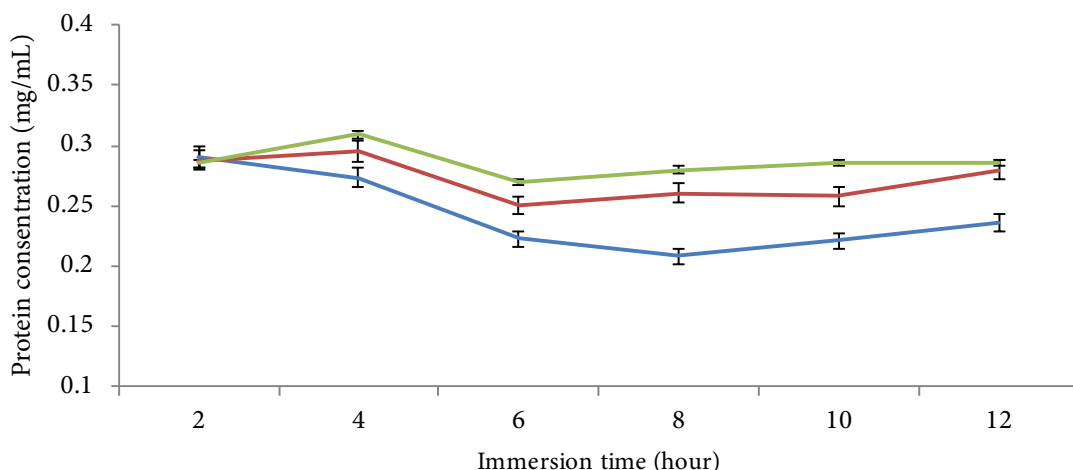


Figure 2 Protein levels dissolved in KOH solution remaining pretreatment swim bladder of *Pangasius* sp. every 2 hours immersion (—) KOH 0.05 M; (—) KOH 0.1 M; (—) KOH 0.5 M.

bahan mengembang karena masuknya air dalam serat kolagen. Hal ini terjadi karena adanya gaya elektrostatis antara gugus polar pada serat kolagen dengan H⁺ dari asam atau terbentuknya ikatan hidrogen antara gugus non-polar pada serat kolagen dengan H⁺ dari asam. Pengembangan tersebut akan merusak struktur serat kolagen karena terganggunya ikatan non kovalen sehingga akan melarutkan kolagen pada larutan asam asetat (Jaswir *et al.* 2011).

Perlakuan asam asetat terbaik dipilih berdasarkan banyaknya kolagen terlarut dan derajat pengembangan kolagen yang dihasilkan setelah perendaman asam asetat. Hasil uji kelarutan kolagen dan derajat pengembangan kolagen dapat dilihat pada *Figure 3* dan *Figure 4*.

Kelarutan (solubilitas) adalah kemampuan zat terlarut (suatu zat kimia tertentu) untuk larut dalam suatu pelarut. Hasil sidik ragam memperlihatkan adanya interaksi antara asam asetat dengan lama perendaman berpengaruh signifikan terhadap kelarutan kolagen (pada taraf signifikan alfa 0,05%) dan dari uji lanjut DMRT menunjukkan nilai kelarutan kolagen paling tinggi pada konsentrasi asam asetat 0,5 M dengan lama perendaman 48 jam. Rerata persentase kelarutan kolagen gelembung renang ikan patin pada perlakuan terpilih adalah 93,7%. Hal ini menunjukkan

bahwa konsentrasi asam asetat 0,5% dengan lama perendaman 48 jam Memiliki potensi dalam melarutkan atau melepaskan rantai-rantai polipeptida penyusun kolagen menjadi tropokolagen yang terdapat dalam matriks. Liu *et al.* (2015a) menyatakan bahwa konsentrasi asam asetat 0,5 M dapat melarutkan kolagen dengan baik. Wang *et al.* (2015) menyatakan bahwa Kelarutan kolagen berhubungan dengan protein terlarut, dimana kadar protein kolagen akan cenderung meningkat dengan semakin tingginya jumlah protein terlarut. Peningkatan kadar protein terlarut dipengaruhi oleh perubahan jumlah struktur ikatan asam amino yang menyusun protein kolagen.

Ekstraksi dengan larutan asam asetat mengakibatkan gelembung renang ikan patin mengembang (*swelling*). Hasil uji DMRT menunjukkan bahwa derajat pengembangan tertinggi diperoleh dari perlakuan dengan konsentrasi 0,5 M dalam waktu 48 jam. Nilai derajat pengembangan kolagen tertinggi terjadi pada konsentrasi 0,5 M dengan lamaperendaman 48 jam (94,87%), sedangkan derajat pengembangan kolagen terendah pada konsentrasi asam asetat 0.75 M dengan lamaperendaman 72 jam (89,38%) (*Figure 4*).

Jaswir *et al.* (2011) menyatakan bahwa *swelling* yang terjadi pada suatu bahan disebabkan karena perendaman bahan

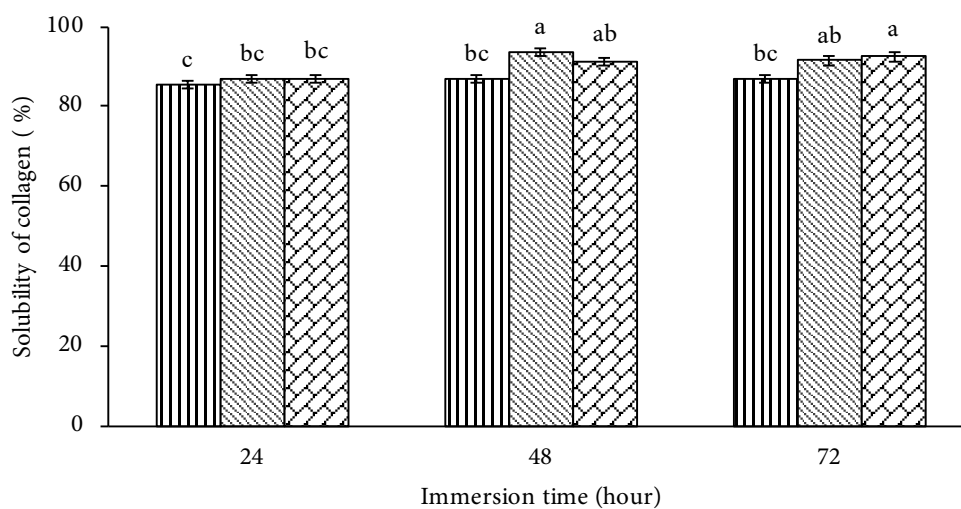


Figure 3 Percentage of solubility of collagen in swim bladder of catfish in acetic acid 0.25 M (▨), 0.50 M (▩) dan 0.75 M (▧). Duration of soaking 24, 48 and 72 hours.

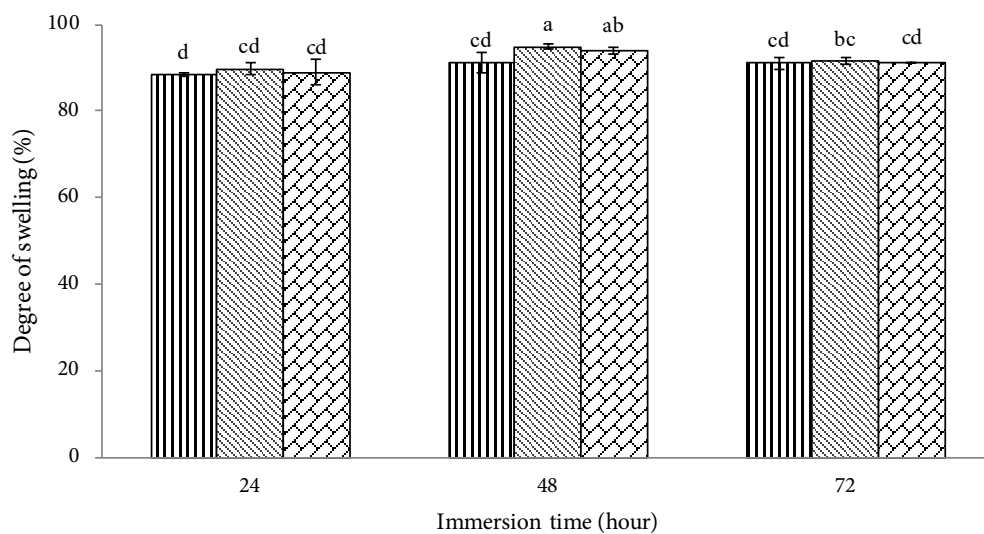


Figure 3 Percentage degree of swelling of catfish swim bladder of catfish in acetic acid 0.25 M (III), 0.50 M (X) dan 0.75 M (Z). Duration of soaking 24, 48 and 72 hours.

didalam asam. Hal ini diakibatkan karena masuknya air kedalam serat-serat kolagen. Air yang masuk ke dalam serat kolagen disebabkan terjadinya gaya elektrostatis antara gugus polar pada serat kolagen dengan H^+ dari asam, atau terbentuknya ikatan hidrogen antara gugus non-polar pada serat kolagen dengan H^+ dari asam.

Karakteristik Kolagen Larut Asam (ASC) Gelembung Renang Ikan Patin

Karakteristik kolagen kering Adalah ciri khas tertentu yang berfungsi untuk mengetahui kualitas yang terdapat pada kolagen. Kolagen dari perlakuan terpilih dikarakterisasi sifat fisik dan kimia. Parameter karakterisasi kolagen yang dilakukan meliputi nilai rendemen, gugus fungsi, dan stabilitas termal.

Rendemen

Rendemen kolagen penting untuk diketahui karena menunjukkan berapa persentase bagian yang dapat dimanfaatkan. Rendemen adalah perbandingan antara jumlah kolagen akhir dengan bahan baku mentah. Nilai rendemen kolagen disajikan pada *Table 2*.

Hasil menunjukkan bahwa kolagen gelembung renang ikan patin memiliki rendemen sebesar $16,047 \pm 0,5\%$. Rendemen gelembung renang ikan patin lebih tinggi dibandingkan gelembung renang cunang yaitu $10,290\%$ (Kartika *et al.* 2016) dan gelembung renang tuna sirip kuning yaitu $1,07\%$ (Kaewdang *et al.* 2014). Potaros *et al.* (2009) menyatakan bahwa Nilai rendemen kolagen yang berbeda dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti penggunaan jenis

Table 2 The yield of dried collagen extract using acid soluble collagen (ASC) method

Source of collagen	Yield (%)
Swim bladders of <i>Pangasius sp.</i>	16.047 ± 0.5
Swim bladders of <i>Muraenesox tabalon</i> ¹	10.290
Swim bladders of <i>Thunnus albacares</i> ²	1.07

Information : ¹Kartika *et al.* (2016); ²Kaewdang *et al.* (2014)

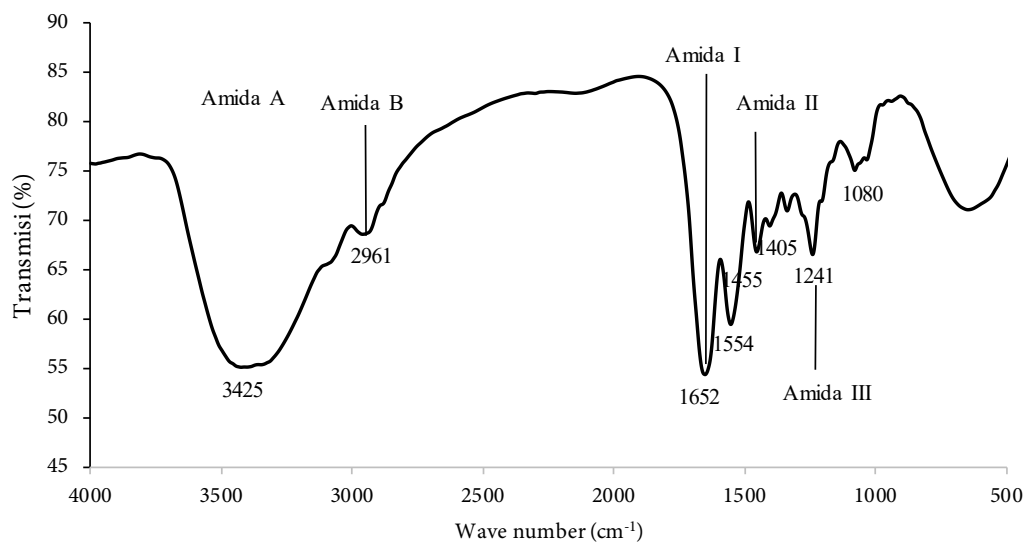


Figure 5 Spectrum of collagen functional groups of *Pangasius sp.* swim blader.

dan konsentrasi larutan, metode ekstraksi, jenis bahan baku yang digunakan, serta lama penyimpanan bahan baku.

Gugus Fungsi

Analisis gugus fungsi bertujuan untuk memastikan senyawa yang dihasilkan merupakan kolagen berdasarkan gugus-gugus fungsi penyusunnya (Paschalis *et al.* 2001). Hasil analisis gugus fungsi terhadap kolagen gelembung renang ikan patin menunjukkan adanya gugus amida A, B, I, II dan III (Figure 5). Amida A pada kolagen gelembung renang ikan patin terletak pada panjang gelombang 3425cm^{-1} . Amida A merupakan *stretching* dari gugus NH yang memiliki puncak serapan pada bilangan gelombang $3400\text{-}3440\text{ cm}^{-1}$ (Veruuraj *et al.* 2013). Amida B kolagen gelembung renang ikan patin terletak pada panjang gelombang 2961cm^{-1} . Puncak serapan amida B terbentuk dari *stretching* CH_2 dengan wilayah serapan pada bilangan gelombang yang mendekati 3100 cm^{-1} (Kong dan Yu 2007).

Gugus fungsi amida I pada kolagen gelembung renang berada pada puncak wilayah serapan bilangan gelombang 1652 cm^{-1} . Kong dan Yu (2007) amida I memiliki wilayah serapan pada kisaran $1600\text{-}1690\text{ cm}^{-1}$ yang menunjukkan vibrasi $\text{C}=\text{O}$ *stretching*. Amida II dan III kolagen gelembung renang ikan patin memiliki bilangan gelombang

1554 cm^{-1} dan 1241 cm^{-1} . Kong dan Yu (2007) menyatakan puncak serapan amida II dan amida III berada pada kisaran $1480\text{-}1575\text{ cm}^{-1}$ dan $1229\text{-}1301\text{ cm}^{-1}$. Intensitas amida III berkaitan dengan adanya struktur *triple helix* yang menjadi ciri khas kolagen (Muyonga *et al.* 2004). Perubahan struktur kolagen menjadi gelatin ditandai dengan hilangnya struktur *triple helix* dikarenakan adanya perubahan *alpha helix* menjadi *single helix* dan nilai bilangan panjang gelombang kisaran 1235 cm^{-1} . Hal ini menunjukkan bahwa kolagen gelembung renang dengan ekstraksi asam asetat $0,5\text{ M}$ dengan waktu perendaman 48 jam belum terdenaturasi menjadi gelatin.

Stabilitas Termal Kolagen Gelembung Renang Ikan Patin

Pengujian stabilitas termal bertujuan untuk mengetahui suhu denaturasi kolagen. Kolagen gelembung renang ikan patin memiliki transisi gelas (T_g) pada suhu 84°C . Hasil penelitian ini lebih tinggi dari kolagen gelembung renang ikan cunang dengan suhu transisi gelas $62,22^\circ\text{C}$ (Kartika *et al.* 2016). Suhu transisi gelas sangat berkorelasi erat dengan kandungan asam amino hidroksiprolina dan prolina. Kandungan asam amino (hidroksiprolina dan prolina) yang semakin tinggi akan meningkatkan stabilitas termal kolagen (Sinthusamran *et al.* 2013). Ahmad dan Benjakul (2010) menyatakan

perbedaan stabilitas termal dari kolagen ini dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu perbedaan lingkungan hidup, umur panen dan komposisi asam amino sebagai pembentuk struktur *triple helix* kolagen.

KESIMPULAN

Gelembung renang ikan patin memiliki kandungan protein yang tinggi yaitu 85,26% (bk) dan memiliki kandungan asam amino penciri kolagen yang tinggi yaitu alanina (23,85 mg/g), glisina (56,85 mg/g) dan prolina (31,03 mg/g). Proses *pretreatment* dengan larutan KOH terpilih yaitu pada konsentrasi 0,05 M dengan lama perendaman 8 jam dan perlakuan terpilih dalam proses ekstraksi menggunakan asam asetat yaitu pada konsentrasi 0,5 M selama 48 jam dengan rendemen 16,047%. Kolagen larut asam dengan perlakuan terbaik memiliki spektra gugus fungsi amida A, B, I, II, dan III serta memiliki Tg 88°C.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad M, Benjakul S. 2010. Extraction and characterisation of pepsin solubilised collagen from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*). *Food Chemistry*. 120(3): 817-824.
- [AOAC] Association of Official Analytical Chemist. 2005. *Official Methods of Analysis (18 ed) of the Association of Official Analytical Chemist Inc.* Mayldan (US): AOAC.
- Ayas D, Ozugul Y. 2011. The chemical composition of carapace meat of sexually mature blue crab in the Mersin Bay. *Journal Fisheries of Science*. 5(4): 308-316.
- Bae I, Osatomi K, Yoshida A, Osako K, Yamaguchi A, Hara K. 2008. Biochemical properties of acid-soluble collagens extracted from the skins of underutilized fishes. *Food Chemistry*. 108(1): 49-54.
- Bradford MM. 1976. A rapid dan sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72(1-2): 248-254.
- Chen S, Chen H, Xie Q, Hong B, Chen J, Hua Fang, Bai K, He J, Yi R, Wu H. 2016. Rapid isolation of high purity pepsin-soluble type I collagen from scales of red drum fish (*Sciaenops ocellatus*). *Food Hydrocolloids*. 52(C): 468- 477.
- Devi HLNA, Suptijah P, Nurilmala M. 2017. Efektifitas alkali dan asam terhadap mutu kolagen dari kulit ikan patin. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 20(2): 255-265.
- Gadi DS, Trilaksani W, Nurhayati T. 2017. Histologi, ekstraksi dan karakterisasi kolagen gelembung renang ikan cunang *Muarenesox talabon*. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis*. 9(2): 665-683.
- Gómez-Guillén MC, Giménez B, López-Caballero ME, Montero MP. 2011. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids*. 25(8): 1813-1827.
- Hashim P, Ridzwan M, Bakar J dan Hashim MD. 2015. Collagen in food and beverage industries. *International Food Research Journal*. 22(1): 1-8.
- Hema GS, Shyni K, Mathew S, Anandan R, Ninan G, Lakshmanan PT. 2013. A simple method for isolation of fish skin collagen-biochemical characterization of skin collgagen extracted from albacore tuna (*Thunnus alalunga*), dog shark (*Scoliodon sorrakowah*), and rohu (*Labeo rohita*). *Scholars Research Library Annals of Biological Research*. 4(1): 271-278.
- Hickman D, Sim TJ, Miles CA, Bailey AJ, Mari MD. 2000. Isinglass/Collagen: Denaturation and Functionality. *Journal Biotechnol*. 79(3): 245-257.
- Holma K, Ayinsa, Maalekuu BK. 2013. Effect of traditional fish processing methods on the proximate composition of red fish stored under ambient room conditions. *American Journal of Food Nutrition*. 3(3): 73-82.
- Huang YR, Shiao CY, Chen HH, Huang BC. 2011. Isolation and characterization of acid and pepsin-solubilized collagens from the skin of balloon fish (*Diodon holocanthus*). *Food Hydrocolloids*. 25(6): 1507-1513.
- Jaswir I, Monsur HA dan Salleh HM. 2011. Nano-structural analysis of fish collagen

- extracts for new process development. *Biotechnology*. 10(81): 18847- 18854.
- Kaewdang O, Benjakul S, Kaewmanee W. 2014. Characteristic of collagens from the swim bladders of yellowfin tuna (*Thunnus albacore*). *Food Chemistry*. 155: 264-270.
- Kartika IWD, Trilaksana W, Adnyane IKM. 2016. Karakterisasi kolagen dari limbah gelembung renang ikan cunang hasil ekstraksi asam dan hidrotermal. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 19(3): 222-232.
- Kittiphattanabawon P, Soottawat Benjakul S, Visessanguan W, Nagai T, Tanaka M. 2005. Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). *Food Chemistry*. 89(3): 363-372.
- Kittiphattanabawon P, Benjakul S, Visessanguan W, Shahidi F. 2010. Isolation and characterization of collagen from the cartilages of brownbanded bamboo shark (*Chiloscyllium punctatum*) and blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*). *Food Science and Technology*. 43(5): 792-800.
- [KKP] Kementerian Kelautan dan Perikanan. 2018. *Produktivitas perikanan Indonesia. Pusat Data Statistika dan Informasi Kementerian Kelautan dan Perikanan Tahun 2018*. Jakarta (ID): Kementerian Kelautan dan Perikanan.
- Kong J dan Yu S. 2007. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 39(8): 549-559.
- Li H, Liu BL, Gao LZ, Chen HL. 2004. Studies on bullfrog skin collagen. *Food Chemistry*. 84(1): 65-69.
- Liu D, Liang L, Joe M, Zhou RP. 2012. Extraction and characterisation of pepsinsolubilised collagen from fins, scales, skins, bones and swim bladders of bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*). *Food Chemistry*. 133: 1441-1448.
- Liu D, Wei G, Li T, Hua J, Lu J, Regenstein JM, Zhou P. 2015a. Effects of alkaline pretreatments and acid extraction conditions on the acid-soluble collagen from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin. *Food Chemistry*. 172: 836-843.
- Liu D, Zhang X, Li T, Yang H, Zhang H, Regenstein JM, and Zhou P. 2015. Extraction and characterization of acid and pepsin soluble collagens from the scales, skins and swim bladders of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Food Bioscience*. 9: 68-74.
- Mahan LK, Stump SE. 2008. *Krause's Food and Nutrition Therapy*. International Edition 12. Missouri (US): Elsevier.
- Muyonga JH, Cole CGB, Duodu KG. 2004. Characterization of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). *Food Chemistry*. 85: 81-89.
- Ngili Y. 2009. *Biokimia Metabolisme dan Bioenergetika*. Edisi ke-1. Yogyakarta (ID): Graha Ilmu.
- Nollet LML. 1996. *Handbook of Food Analysis: Physical characterization dan nutrient analysis*. Second Edition. New York (US): CRC Press LLC.
- Nurjanah, Abdullah A. 2010. *Cerdas memilih Ikan dan Mempersiapkan Olahannya*. Bogor (ID): IPB Press.
- Pal GK, Nidheesh T, Suresh PV. 2015. Comparative study on characteristics and in vitro fibril formation ability of acid and pepsin soluble collagen from the skin of catla (*Catla catla*) and rohu (*Labeo rohita*). *Food Research International*. 76(Pt 3): 804-812.
- Paschalis EP, Verdellis K, Doty SB, Boskey AL, Mendelsohn R, Yamauchi M. 2001. Spectroscopic characterization of collagen cross-links in bone. *Bone and Mineral Research*. 16(10): 1821-1828.
- Potaras T, Raksakulthai N, Runglerdkreangkrai J dan Worawattanamateekul W. 2009. Characteristics of collagen from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin isolated by two different methods. *Kasetsart Journal-Natural Science*. 43: 584-593.
- Putra ABN, L Sahubawa, dan N Ekantri. 2013. Ekstraksi dan karakterisasi kolagen dari kulit ikan nila hitam *Oreochromis niloticus*. *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*. 8(2): 171-180.
- Ramachandran GN, Reddi AH. 2013.

- Biochemistry of collagen. New York (US): Springer Science and Business Media.
- Riyanto B. 2006. Pengembangan pelapis *edible* dari *isinglass* dan aplikasinya untuk mempertahankan mutu udang masak. [Tesis]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Rochdi A, Foucat L, Renou JP. 2000. NMR and DSC studies during thermal denaturation of collagen. *Food Chemistry*. 69(3): 295-299.
- Santos MH, Silva RM, Dumont VC, Neves JS, Mansur HS, Heneine LGD. 2013. Extraction and characterization of highly purified collagen from bovine pericardium for potential bioengineering applications. *Materials Science and Engineering*. 33(2): 790-800.
- Shon J, Eo J, Hwang SJ, Eun J. 2011. Effect of processing conditions on functional properties of collagen powder from skate (*Raja kenosjoi*) skins. *Food Science Biotechnology*. 20(1): 99-106.
- Silva MR, Celem LR, Silva SR, Costa APF. 2013. Anti aging cosmetics: Facts and controversies. *Clinics in Dermatology*. 31(6): 750-758.
- Sinthusamran S, Benjakul S, Kishimura H. 2013. Comparative study on molecular characteristics of acid soluble collagens from skin dan swim bladder of seabass (*Lates calcarifer*). *Food Chemistry*. 138(4): 2435-2441.
- Steel RGD, Torrie JH. 1993. *Prinsip dan Prosedur Statistika, Suatu Pendekatan Biometrik*. Jakarta (ID): Gramedia Pustaka Utama. Terjemahan dari: *Principles and Procedures of Statistics*.
- Tamilmozhi S, Veeruraj A, Arumugam M. 2013. Isolation and characterization of acid and pepsin-solubilized collagen from the skin of sailfish (*Istiophorus platypterus*). *Food Research International*. 54: 1499-1505.
- Trilaksana W, Nurjanah, Utama HW. 2006. Pemanfaatan gelembung renang ikan patin (*Pangasius hypophthalmus*) sebagai bahan baku *isinglass*. *Buletin Teknologi Hasil Perikanan*. 9(1): 12-21.
- Veruuraj A, Arumugam M, Balasubramanian T. 2013. Isolation and characterization of thermostable collagen from the marine eel-fish (*Evenchelys macrura*). *Process Biochemistry*. 48:1592-1602.
- Walters BD, Stegemann JP. 2014. Review: Strategies for directing the structure and function of three-dimensional collagen biomaterials across length scales. *Acta Biomaterialia*. 10(4): 1488-1501.
- Wang L, Liang Q, Chen T, Wang Z, Xu J, Maa H. 2015. Characterization of collagen from the skin of amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*). *Food Hydrocolloids*. 38: 104-109.
- Yan M, Li B, Zhao X, Ren G, Zhuang Y, Hou H, Zhang X, Chen I, Fan Y. 2008. Characterization of acid soluble collagen from the skin of walleye pollock (*Theragra chalcogramma*). *Food Chemistry*. 107: 1581-1586.