

KARAKTERISTIK EMULSI BEBERAPA FRAKSI GELATIN DARI KULIT IKAN NILA (*Oreochromis niloticus*)

*The Emulsion Characteristic of Gelatin Fraction from Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Skin*

Suryanti^{1*}, Djagal Wiseso Marseno², Retno Indrati², dan Hari Eko Irianto¹

¹Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan. Jl. KS. Tubun, Petamburan VI, Slipi, Jakarta, Indonesia

²Fakultas Teknologi Pertanian. Universitas Gajah Mada. Jl. Flora No. 1 Bulaksumur. Yogyakarta, Indonesia

*Korespondensi Penulis: suryanti_jkt@yahoo.com

Diterima: 25 Januari 2017; Disetujui: 29 April 2017

ABSTRAK

Fraksinasi ekstrak gelatin dari kulit ikan nila (*Oreochromis niloticus*) dengan menggunakan kantong dialisis MWCO 100 kD telah dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakteristik emulsi dari fraksi gelatin yang diperoleh melalui proses asam asetat 0,10 M (GAs) dan asam sitrat 0,05 M (GSi). Fraksi gelatin GAs yang diperoleh memiliki distribusi berat molekul 13,6-218,87 kD dan 15,27-61,1 kD sedangkan fraksi gelatin GSi sebesar 107,5-142,23 kD dan 12,5-82,9 kD. Gugus fungsional molekul dari keempat fraksi gelatin tersebut terdiri dari amida I (1648 cm⁻¹), amida II (1452 cm⁻¹) dan amida III (1089 cm⁻¹). Karakteristik emulsi yang meliputi sifat emulsi (aktivitas dan stabilitas emulsi) serta ukuran partikel emulsi semakin meningkat dengan semakin meningkatnya berat molekul. Zeta potensial droplet emulsi gelatin dari proses asam sitrat 0,05 M (GSi) lebih banyak bermuatan ion positif daripada proses asam asetat 0,10 M(GAs). Emulsi yang terbentuk dari fraksi GAs dan GSi pada konsentrasi 0,1% termasuk dalam makroemulsi dengan ukuran droplet >100 nm dan stabilitas mencapai 22,62 menit yang dapat diaplikasikan pada produk pangan seperti *ice cream*, *whipping cream*, dan *salad dressing*.

KATA KUNCI: ikan nila, *Oreochromis niloticus*, emulsi, gelatin

ABSTRACT

*Fractionation of gelatin extract from tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin was done by using dialysis bag of MWCO 100 kD. The aim of this research was to determine the emulsion characteristics of gelatin fraction from the process of 0.10 M acetic acid (GAs) and 0.05M citric acid (GSi). Gelatin GAs fraction has a molecular weight distribution of 13.6 to 218.87 kD and 15.27 to 61.1 kD while gelatin GSI fraction of 107.5 to 142.23 kD and 12.5 to 82.9 kD. Functional groups of the four fractions of gelatin molecules consist of amide I (1648 cm⁻¹), amide II (1452 cm⁻¹) and amide III (1089 cm⁻¹). Emulsion characteristics including the emulsion properties (activity and stability of emulsion) and particle size emulsion increased with the increasing of molecular weight. Zeta potential of emulsion droplet gelatin from 0.05M citric acid (GSi) method produced more positively charged ions than 0.10 M acetic acid process (GAs). Emulsion created by 0,1% GAs and GSi fraction was refer to macroemulsion with droplet size >100 nm and stability 22.62 minutes, which could be applied for food product such as ice cream, whipping cream and salad dressing..*

KEYWORDS: *tilapia, Oreochromis niloticus, emulsion, gelatin*

PENDAHULUAN

Gelatin merupakan hasil dari proses hidrolisis kolagen yang banyak ditemukan pada kulit, tulang dan jaringan otot hewan. Gelatin diperoleh melalui proses pra-perlakuan asam (gelatin tipe A) dengan nilai titik isoelektrik pada pH 7-9 atau basa (gelatin

tipe B) dengan nilai titik isoelektrik pada pH 4,7-5,4 (Anon, 2012). Umumnya, gelatin yang berasal dari kulit ikan diperoleh melalui proses pra-perlakuan asam karena jaringan kolagen pada kulit ikan lebih lunak. Perlakuan asam menyebabkan terlepasnya ikatan antara gugus karboksil dan gugus amida dalam molekul kolagen *triple helix* hingga terpecah menjadi

beberapa untaian rantai α -*helix* dan diperoleh berat molekul gelatin dalam kisaran yang luas yaitu 90-300 kD (Phillip & Williams, 2009).

Gelatin banyak digunakan dalam industri pangan, farmasi dan medis karena memiliki sifat fungsional sebagai pembentuk gel, pengental dan emulsifier. Namun penggunaan gelatin sebagai emulsifier masih terbatas karena berat molekul yang besar dapat menghasilkan ukuran partikel droplet emulsi yang besar (Surh, Decker, & Mc Clement, 2006). Beberapa produk pangan umumnya membutuhkan emulsifier yang dapat menghasilkan ukuran partikel droplet emulsi yang kecil sehingga penampakan emulsi menjadi lebih jernih.

Emulsi adalah suatu dispersi dua cairan (minyak dan air) yang tidak dapat tercampur, dimana salah satu cairan terdispersi di dalam cairan lainnya sebagai droplet kecil dengan ukuran berkisar antara 0,1-100 μm (Mc Clement, 2005). Kondisi ini membutuhkan bahan pembentuk dan penstabil emulsi (emulsifier) yang dapat menyerap fase minyak dan air yang dapat melindungi droplet dari kerusakan (Hasenhuettl & Hartel, 2008). Gelatin memiliki kemampuan sebagai emulsifier karena bersifat *amphiphilic* dengan adanya kandungan asam amino yang bersifat hidrofilik dan lipofilik sehingga dapat menimbulkan aktifitas pada permukaan molekulnya (Ward & Courts, 1977). Muatan dalam molekul gelatin menyebabkan gelatin dapat terserap pada antarmuka fase minyak dan air dalam sistem emulsi, dan membentuk jaringan polimer berupa lapisan (*film*) pada permukaan droplet (Hattrem, Molnes, Haug, & Draget, 2015).

Gelatin dengan kisaran distribusi berat molekul yang luas terdiri dari komponen sub unit α , β dan γ . Sub unit β merupakan dimer dari sub unit α , sedangkan sub unit γ merupakan trimer sub unit α (Ward & Courts, 1977). Sub unit α mengandung beberapa jenis asam amino yang berbeda sehingga sangat berpengaruh pada sifat fungsional gelatin. Gelatin dengan berat molekul besar memiliki sub unit α yang lebih banyak dapat menghasilkan sifat fungsional seperti kekuatan gel yang lebih besar.

Pemisahan sub unit α dalam molekul gelatin dapat dilakukan berdasarkan ukuran berat molekul menggunakan membran dialisis dengan tujuan fraksinasi yaitu untuk memisahkan dua fraksi komponen yang diinginkan. Membran dialisis komersial umumnya berasal dari selulosa yang merupakan polisakarida yang berasal dari tumbuhan yang tersusun dari beberapa unit glukosa yang terhubung dalam ikatan β -1,4 glukosa. Struktur rantai linear selulosa merupakan polimer yang bersifat hidrofilik karena terbentuk dari ikatan hidrogen intramolekular diantara grup hidroksil yang terdapat

pada molekul glukosa, sehingga dapat menyerap protein larut air dan melewati membran. Pada pemisahan ekstrak protein dengan membran dialisis akan terpisah fraksi makromolekul yang akan tertahan didalam kantong dialisis dan mikromolekul akan keluar dari kantong dialisis sehingga diperoleh fraksi berat molekul yang berbeda (Mulder, 1996).

Fraksinasi gelatin dari kulit ikan *Saithe* (*P. virens*) dapat dilakukan menggunakan membran dialisis dengan *molecule weight cut off* (MWCO) 100 kD dalam larutan *MILLI-Q water* pada suhu 40 °C (Eysturskarð, Haug, Elharfaoui, Djabourov, & Drage, 2009). Gelatin dengan kandungan sub unit α yang besar dapat menghasilkan sifat fungsional pembentukan gel serta aktivitas dan stabilitas emulsi yang tinggi (Ahmad & Benjakul, 2011 ; Eysturskarð, et.al., 2009). Surh et.al., (2006) menyatakan gelatin tipe A dapat menjadi alternatif sebagai emulsifier dari protein dalam sistem emulsi minyak dalam air karena dapat membentuk droplet bermuatan kationik pada kisaran pH yang lebih luas. Muatan kation pada permukaan droplet dapat mencegah oksidasi minyak dalam droplet dengan adanya kation mineral seperti Fe^{2+} atau Fe^{3+} yang umumnya terdapat dalam fase air.

Isolasi gelatin dari kulit ikan nila (*Oreochromis niloticus*) dari pra-perlakuan asam asetat 0.10 M dan asam sitrat 0,05 M menghasilkan distribusi berat molekul sebesar 38-241 kD dan 23-145 kD dengan kandungan sub unit α yang berbeda menghasilkan kekuatan gel 346,16 g bloom dan 13,52 g bloom (Suryanti, Indrati, Irianto, & Marseno, 2016). Gelatin ikan tipe A dengan berat molekul \approx 55 kD dan \approx 120 kD menghasilkan ukuran rata-rata diameter droplet emulsi sebesar 0.35 μm dan 0.71 μm (Surh et al., 2006). Selain itu, gelatin dari kulit babi dengan berat molekul 50-100 kDa menghasilkan stabilitas emulsi yang baik pada pH 4,8 dalam sistem emulsi minyak dalam air (Liu, Wang, Barrow, & Adhikari, 2014). Hal ini menunjukkan berat molekul gelatin dengan kandungan sub unit α yang berbeda memiliki kemampuan sebagai emulsifier. Dalam penelitian ini dilakukan fraksinasi gelatin dari kulit ikan nila (*O. niloticus*) terhadap karakteristik emulsi. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui karakteristik emulsi dari beberapa fraksi berat molekul gelatin dari kulit ikan nila (*O. niloticus*).

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan utama yang digunakan meliputi kulit ikan nila (*O. niloticus*) yang diperoleh dari PT. Aquafarm di Semarang Jawa Tengah dan minyak kedelai komersial. Bahan kimia yang digunakan meliputi

asam asetat (teknis), asam sitrat (teknis), akrilamid, N'N'N' Bis-Akrilamid, glycine (Sigma Chemical Co.), protein leader (10-260 kD) (Thermo Scientific), HCl, NaOH, Tetramethylethylenediamine (TEMED) (Thermo Scientific), ultra tris-base, ammonium persulfate, Coomassie brilliant blue R250 (Sigma Chemical Co.), methanol, asam asetat glasial dan MQ-water.

Peralatan yang digunakan meliputi kantong dialisis (*cellulose membrane MWCO 100 kD*) (*Spectrum Laboratories Inc.*, DG Breda, Netherlands), pH meter, PAGE (*Polyacrylamide gel electrophoresis*), *viscometer brookfield*, *UV-Vis spectrophotometer* (Shimadzu), *Particle Size Analyzer* (Delsa Max PRO. Beckman Coulter) dan *optical light microscope* (Leica ICC50 H).

Metode

Isolasi dan fraksinasi gelatin dari kulit ikan nila (*O. niloticus*)

Isolasi gelatin dari kulit ikan nila *O. niloticus*) dilakukan secara asam melalui pra-perlakuan asam asetat 0,10 M dan asam sitrat 0,05 M (Suryanti et al., 2016). *Degreasing* dilakukan dengan pencelupan dalam air (60 - 70 °C) selama ± 10 detik dan dilanjutkan dengan pengecilan ukuran kulit nila ± (4 x 4 cm). Pra-perlakuan dilakukan dengan proses asam asetat 0.10 M selama 2 jam dan asam sitrat 0.05 M selama 1 jam (1:8 (b/v)). Pencucian dalam air bersih hingga pH mendekati netral dan pengecilan ukuran kulit dengan alat *homogenizer* (± 10 detik). Ekstraksi menggunakan akuades dengan rasio 1:3 (b/v) pada suhu 80 °C selama 3 jam hingga diperoleh ekstrak gelatin. Fraksinasi ekstrak gelatin dari perlakuan kedua jenis asam tersebut menggunakan kantong dialisis MWCO 100 kD dalam akuades pada suhu kamar selama 12 jam hingga masing-masing diperoleh dua fraksi dengan berat molekul yang berbeda. Kemudian larutan dialisat yang dihasilkan dipekatkan dengan *vacum evaporator* pada suhu 40 °C dan dikeringkan dengan konsentrator hingga diperoleh fraksi gelatin kering.

Analisis molekul fraksi gelatin

Analisis molekul fraksi gelatin yang dilakukan meliputi analisis berat molekul dan analisis gugus fungsional molekul gelatin. Analisis berat molekul fraksi gelatin menggunakan SDS PAGE (*Polyacrylamide gel electrophoresis*) berdasarkan metoda yang dikembangkan oleh Biorad Laboratories (2016) menggunakan *stacking gel* 5 % dan *resolving gel* 10 % dengan menggunakan marker protein *ladder* (10-260 kD) (*Thermo Scientific*) yang dijalankan dalam Elektroforesis pada tegangan 200 V dan 65 mA.

Pewarnaan gel dengan *Coomassie brilliant blue R250* dan penghilangan warna dengan campuran larutan methanol : asam asetat glasial : akuades dengan rasio sebesar 1:1:8 (v/v/v).

Analisis gugus fungsional molekul fraksi gelatin dilakukan dengan menggunakan alat *Spectra Fourier transform infrared* (FTIR) (Montoya et al., 2013). Sampel fraksi gelatin kering ditambah KBr (1:100) dan dihaluskan hingga tercampur merata, kemudian dilakukan pengepresan dengan pompa vakum selama 15 menit. Pembacaan absorbansi dilakukana pada bilangan gelombang 400 - 4000 cm⁻¹.

Analisis dan karakteristik emulsi

Analisis dan karakteristik emulsi diawali dengan pembuatan emulsi gelatin berdasarkan Ahmad dan Benjakul (2011) dan Ktari et al. (2014). Gelatin (0,1%) ditambahkan minyak kedele dengan rasio 3:1(v:v) kemudian dihomogenasi dengan *homogenizer ultratorax* pada kecepatan 7000 rpm selama 3 menit pada suhu kamar. Karakteristik emulsi gelatin diketahui melalui analisis pH emulsi, sifat emulsi, ukuran partikel emulsi dan zeta potensial dan mikrostruktur emulsi.

Analisis pH emulsi dilakukan menggunakan pH meter pada emulsi yang terbentuk dari beberapa fraksi gelatin pada suhu kamar (Ward & Courts, 1977 modifikasi).

Analisis sifat emulsi yang dilakukan meliputi *Emulsion Activity Index* (EAI) dan *Emulsion Stability Index* (ESI) yang diperhitungkan berdasarkan pada metode yang dikembangkan oleh Pearce dan Kinsella (1978) dan Ahmad dan Benjakul (2011) sebagai berikut.

$$EAI \left(\frac{m^2}{g} \right) = \frac{2\gamma_2 303 \chi A_0 \chi F_p}{\phi \chi C \chi l} \dots\dots\dots (1)$$

$$ESI \text{ (menit)} = \frac{A_0}{A_0 - A_{10}} \chi \Delta t \dots\dots\dots (2)$$

Keterangan:

A₀ = Absorbansi pd 500 nm (menit ke-0)/
Absorbance at 500 nm (min 0)

A₁₀ = Absorbansi pd 500 nm (menit ke-10)/
Absorbance at 500 nm (min 10)

Δt = 10 menit/10 minutes

F_p = Faktor pengenceran/*Dilution factor*

Ø = Fraksi minyak (0.25)/*Oil fraction*

C = Konsentrasi gelatin/*Gelatin concertation*
(g/m³)

l = Panjang kuvet/*Cuvet size* (m)

Ukuran partikel droplet emulsi gelatin dan nilai zeta potensial dianalisis berdasarkan metoda Hattrem et al. (2015) yang dimodifikasi. Emulsi gelatin ditambahkan dengan *MQ water* dengan rasio 1:100 (v/v) pada suhu kamar dan di vortex selama 10 detik. Ukuran partikel droplet emulsi dan zeta potensial diukur dengan alat *Particle Size Analyzer (Delsa Max PRO, Beckman Coulter)*. Pengukuran didasarkan pada intensitas penyebaran cahaya laser terhadap larutan emulsi dan kemudian dapat diketahui distribusi ukuran diameter partikel droplet dan zeta potensial.

Analisis mikrostruktur emulsi dilakukan secara visual menggunakan *optical light microscope (Leica ICC50 H)* yang dilengkapi dengan kamera dengan perbesaran 40 kali (Gao et al., 2017 yang dimodifikasi).

Analisis data

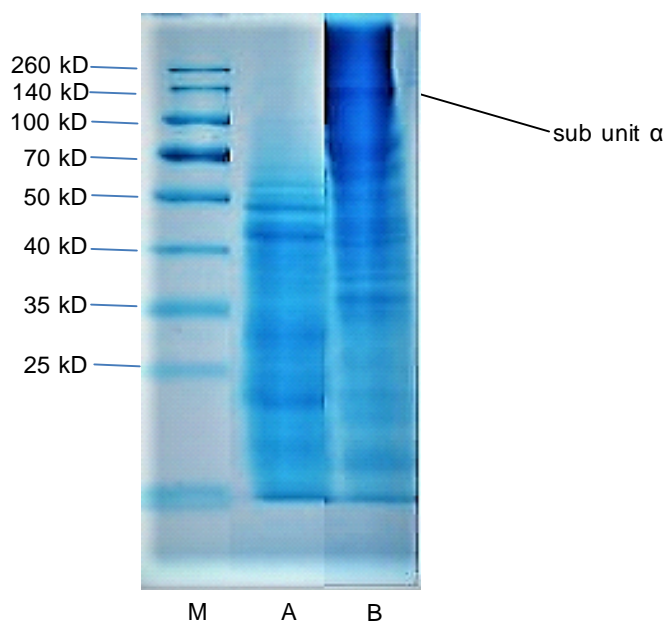
Analisis data dilakukan terhadap semua data hasil analisis (kecuali analisis distribusi berat molekul dan mikrostruktur emulsi) disajikan dalam jumlah rata-rata dan dianalisis statistik menggunakan *one way analysis of variant (ANOVA)* dengan tingkat signifikansi 95% dengan program *SPSS 16 for Windows*. Uji lanjut *Duncan's Multiple Range Test (DMRT)* dilakukan untuk mengetahui perbedaan diantara perlakuan.

HASIL DAN BAHASAN

Distribusi Berat Molekul

Proses pemisahan molekul dengan membran dialisis didasarkan pada ukuran dan bentuk atau struktur molekul yang tertahan dan melewati membran. Hasil dari proses pemisahan suatu molekul dengan membran akan diperoleh dua fraksi molekul yaitu *retentate* (yang terdapat dalam membran) dan *permeate* (yang mengalir keluar melewati membrane) (Mulder, 1996). Gambar 1 dan 2 menyajikan hasil analisis distribusi berat molekul dari fraksinasi ekstrak gelatin kulit ikan nila (*Oreochromis niloticus*) dari proses asam asetat 0,10 M selama 2 jam (GAs) dan proses asam sitrat 0,05 M selama 1 jam (GSi). Jumlah protein fraksi gelatin GAs yang ditanamkan dalam gel sebesar 120 µg sedangkan fraksi gelatin GSi 80 µg.

Dari Gambar 1 diketahui distribusi berat molekul dari dua fraksi gelatin GAs yaitu fraksi GAs *retentate* 100 kD sebesar 13,6-140 kD mengandung sub unit α, sedangkan fraksi GAs *permeate* 100 kD 15,27 - 61,1 kD tidak ditemukan sub unit α. Selain itu, dari Gambar 2 juga diketahui distribusi berat molekul dari fraksi GSi *retentate* 100 kD sebesar 107,5-142,23 kD dan fraksi GSi *permeate* 100 kD 12,5 - 82,9 kD. Pada



Gambar 1. Distribusi berat molekul fraksi gelatin kulit ikan nila (*O. niloticus*) dari proses asam asetat 0,10 M selama 2 jam (GAs). M : marker protein, A : fraksi *retentate* 100 kD, B : fraksi *permeate* 100 kD.

Figure 1. Molecular weight distribution of gelatin tilapia (*O. niloticus*) skin fraction from 0.10 M acetat acid processed for 2 hours (GAs). M : protein marker, A : *retentate* 100 kD fraction, B : *permeate* 100 kD fraction.

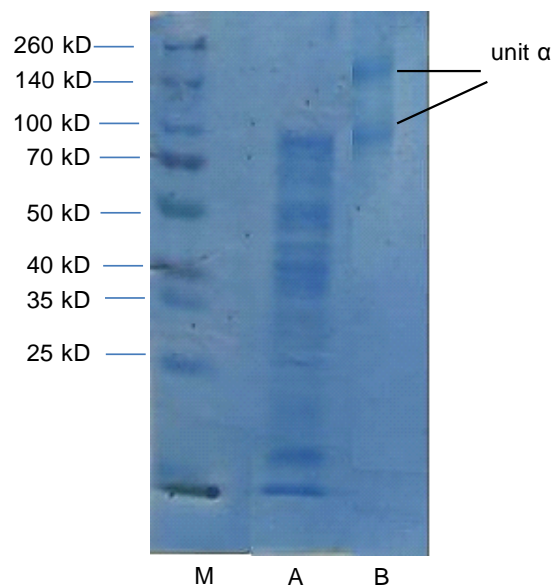
fraksi GSi *retentate* 100 kD mengandung sub unit α , sedangkan fraksi GSi *permeate* 100 kD tidak ditemukan. Gelatin mengandung sub unit α pada kisaran berat molekul 90-< 200 kD, sub unit β pada berat molekul 200-< 270 kD dan sub unit γ pada berat molekul 270-300 kD (Phillip & Williams, 2009). Gelatin dengan kandungan sub unit α yang lebih rendah akan lebih mudah terpisah dalam kantong dialisis. Hal ini terlihat dari hasil proses fraksinasi gelatin GAs belum sempurna terpisah fraksi berat molekulnya karena masih banyak terdapat berat molekul < 100 kD dalam fraksi *retentate*. Gelatin yang diperoleh dari proses asam sitrat 0,05 M selama 1 jam (GSi) memiliki distribusi berat molekul 23-145 kD lebih mudah dipisahkan fraksi berat molekul < 100 kD dan > 100 kD daripada proses asam asetat 0,10 M selama 2 jam (GAs) yang memiliki distribusi berat molekul 38-241 kD banyak mengandung sub unit β (Suryanti et al., 2016).

Pemisahan berat molekul ekstrak gelatin dari kulit ikan *haddock* (*Melanogrammus aeglefinus*), *saithe* (*Pollachius virens*) dan *cod* (*Gadus morhua*) juga telah dilakukan menggunakan membran dialisis MWCO 100 kD dalam *MILLI-Q water* pada suhu 40 °C untuk mengetahui pengaruhnya terhadap sifat fungsional kekuatan gel. Gelatin dengan berat molekul besar (>100 kD) mengandung jumlah sub unit α yang lebih

banyak dan menghasilkan sifat fungsional kekuatan gel yang lebih besar (Eysturskarð, Haug, Elharfaoui, Djabourov, & Draget, 2012) serta aktivitas dan stabilitas emulsi yang tinggi (Ahmad & Benjakul, 2011). Sub unit α_1 dan α_2 dalam molekul gelatin kulit ikan tilapia juga dapat dipisahkan dengan ultrafiltrasi menggunakan membran selulosa MWCO 100 kD. Sub unit α_1 ditunjukkan pada berat molekul 110 kD, sedangkan sub unit α_2 pada berat molekul 200 kD dengan kandungan asam amino terbesar glisin (Chen et. al., 2015). Sub unit α terdiri dari α_1 dan α_2 , dimana rantai α_1 mengandung sedikit asam amino histidin, tirosin, lisin, banyak mengandung hidroksiprolin dan asam amino lipofilik lainnya seperti valin, leusin dan isoleusin dari pada sub unit α_2 (Ward & Court, 1977). Kandungan asam amino dalam sub unit α dengan rasio yang berbeda menyebabkan molekul gelatin memiliki banyak muatan ionik, yang dapat menghasilkan sifat fungsional gelatin yang berbeda pula.

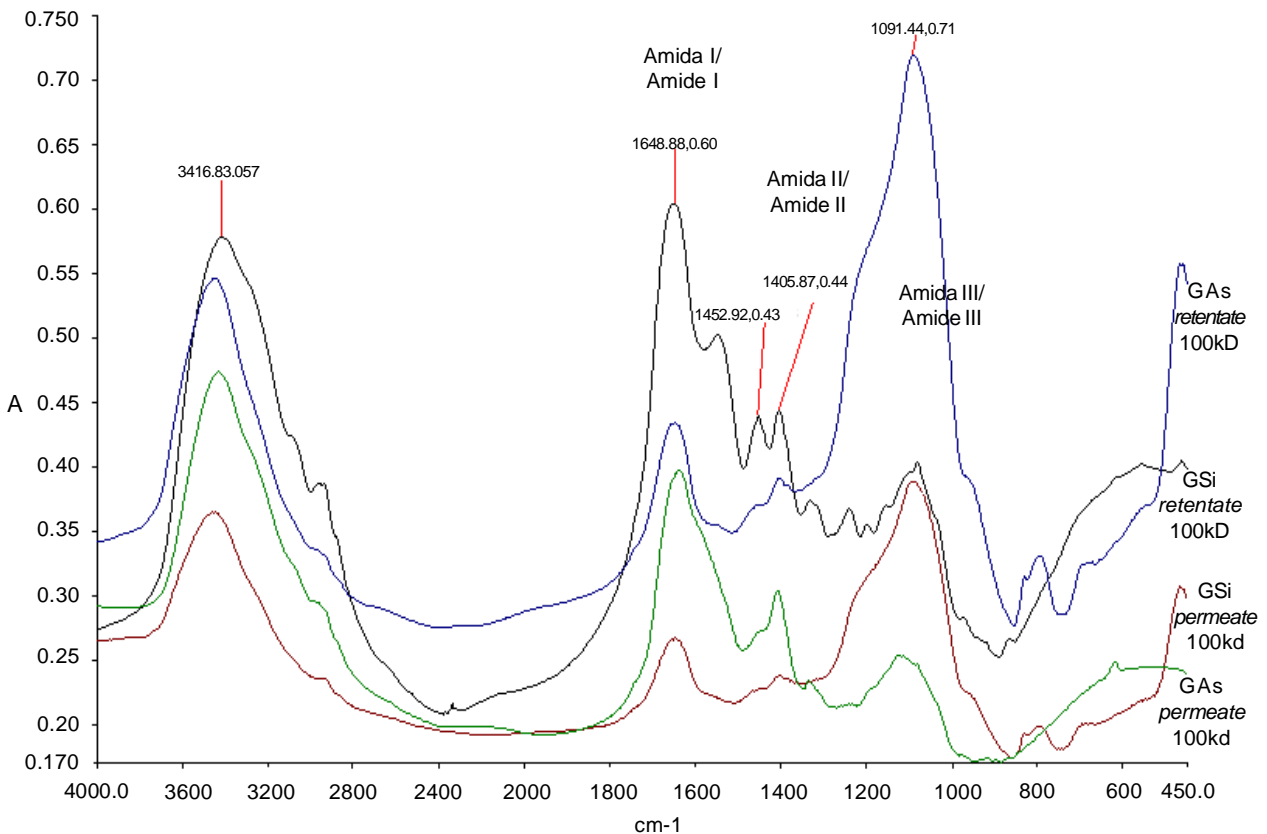
Gugus Fungsional

Gugus fungsional molekul fraksi gelatin kulit ikan nila (*O. niloticus*) dari proses asam asetat 0,10 M selama 2 jam (GAs) dan asam sitrat 0,05 M selama 1 jam (GSi) dapat dilihat pada Gambar 3. Gambar 3 menunjukkan spektra FTIR fraksi molekul GAs dan



Gambar 2. Distribusi berat molekul fraksi gelatin kulit ikan nila (*O. niloticus*) dari asam sitrat 0,05 M selama 1 jam (GSi). M : Marker protein, C : fraksi *retentate* 100 kD, D : fraksi *permeate* 100 kD.

Figure 2. Molecular weight distribution of gelatin tilapia fish (*O. niloticus*) skin fraction from 0.05 M citric acid processed for 1 hour. M : protein marker, C : *retentate* 100 kD fraction, D : *permeate* 100 kD fraction.



Gambar 3. Spektra FTIR fraksi gelatin kulit ikan nila (*O. niloticus*) dari proses asam asetat 0,10 M selama 2 jam (GAs) dan asam sitrat 0,05 M selama 1 jam (GSi).

Figure 3. FTIR spectra of gelatin tilapia fish (*O. niloticus*) skin fraction from 0.10 M acetat acid processed for 2 hours (GAs) and 0.05 M citric acid processed for 1 hour (GSi).

GSi masing-masing yaitu fraksi *retentate* 100kD dan fraksi *permeate* 100kD. Keempat fraksi tersebut memiliki puncak spektra FTIR yang hampir sama yaitu pada area amida I (1648 cm^{-1}) dan amida II (1452 cm^{-1}) dengan puncak tertinggi pada fraksi GSi *retentate* 100kD dan terendah pada fraksi GAs *permeate* 100kD. Area amida I menunjukkan adanya peregangan ikatan rantai ganda (C=O) karena adanya peregangan C-N. Area amida II menunjukkan kombinasi peregangan C-N dan N-H dalam polipeptida. Area amida I dan II tersebut menunjukkan terdapatnya gugus fungsi yang khas rantai α *helix* dalam molekul gelatin yang dihasilkan dari proses hidrolisis molekul kolagen *triple helix* (Ahmad & Benjakul, 2011).

Proses ekstraksi gelatin pada suhu tinggi yang dilanjutkan dengan faksinasi dan pemekatan pada suhu 40 °C dapat melepas ikatan kovalen dalam gugus molekul gelatin sehingga ditemukan gugus polipeptida gelatin pada spektra FTIR. Hal ini diketahui dari Gambar 3 juga terdapat puncak tertinggi pada

spektra 1089 cm^{-1} pada fraksi GAs *retentate* 100kD dan terendah pada fraksi GAs *permeate* 100kD yang menunjukkan terdapatnya potongan rantai α *helix* berupa polipeptida yang diperoleh dari proses fraksinasi dengan membran dialisis. Spektra FTIR pada bilangan gelombang 1240 - 670 cm^{-1} merupakan area amida III yang menunjukkan adanya vibrasi peregangan C-N dan N-H yang ditimbulkan dari peregangan CH_2 dari gugus fungsi glisin dan prolin (Zarai, Balti, Mejdouba, Gargouri, & Sayari, 2012). Amida III pada spektra 1144-985 cm^{-1} menunjukkan peregangan C-O dari rantai peptida (Ahmad & Benjakul, 2011), yang mengindikasikan bahwa molekul kolagen *triple helix* telah hilang selama proses pra-perlakuan dan ekstraksi gelatin (Kaewruang, Benjakul, & Prodpran 2013).

Sifat Emulsi

Nilai *Emulsion Activity Index* (EAI) dan *Emulsion Stability Index* (ESI) gelatin GAs dan GSi *native*

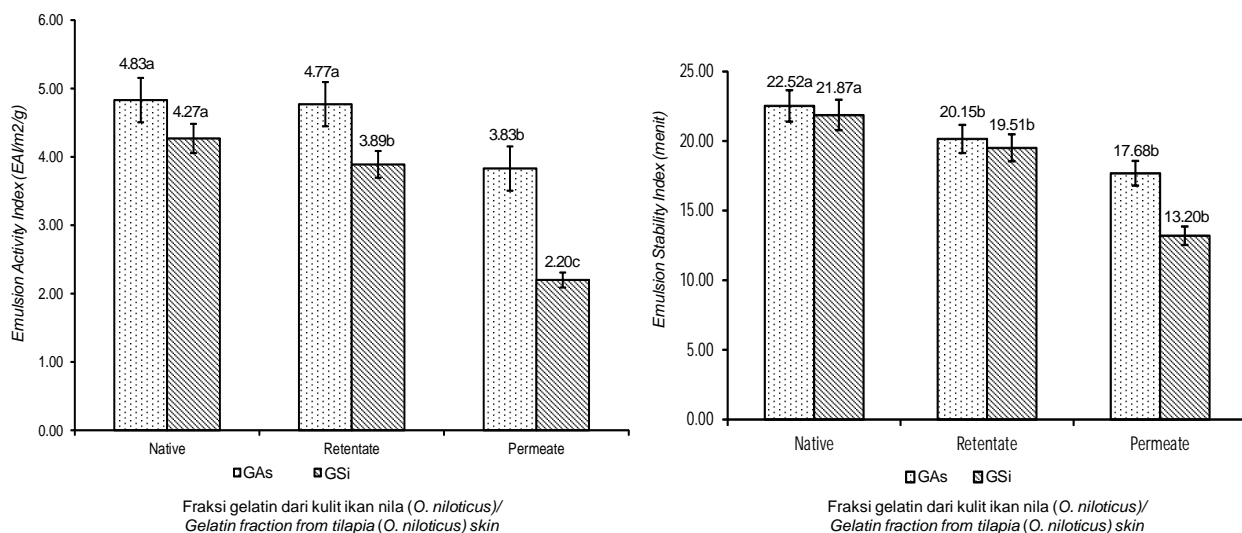
beserta fraksinya pada konsentrasi 0,1% dapat dilihat pada Gambar 4. Secara umum, nilai EAI dan ESI gelatin GAs *native* dengan fraksinya lebih besar daripada GSi *native* nya dengan fraksinya. Nilai EAI tertinggi pada GAs *native* sebesar 4,83 m²/g dan terendah pada fraksi GSi permeate 100kd yaitu 2,20 m²/g sedangkan ESI tertinggi pada GAs *native* yaitu 22,52 menit, dan terendah pada fraksi GSi *retentate* 100kd yaitu 13,20 menit.

Selain itu, gelatin GAs dan GSi *native* tanpa proses fraksinasi memiliki aktifitas emulsi (EAI) dan stabilitas emulsi (ESI) paling tinggi daripada fraksinya (*retentate* 100 kD dan *permeate* 100 kD). EAI gelatin GAs *native* (4,83 m²/g) dan ESI (22,52 menit) lebih besar daripada EAI GSi *native* (4,27 m²/g) dan ESI (21,87 menit). Namun hasil analisis sifat emulsi tersebut menunjukkan molekul gelatin GAs dan GSi *native* menghasilkan aktifitas emulsi yang tidak berbeda selama proses pembentukan emulsi ($p > 0.05$),

sedangkan pada fraksi gelatin GAs dan GSi *retentate* 100 kD memiliki aktifitas dan stabilitas emulsi lebih besar daripada *permeate* 100 kD ($p < 0.05$).

Aktifitas emulsi dari fraksi gelatin dari kulit ikan nila (Gambar 4) lebih rendah daripada gelatin dari kulit ikan *Unicorn leatherjacket* (*Aluterus monoceros*) sebesar 15,16 - 39,17 m²/g pada konsentrasi 1-3%, sedangkan stabilitas emulsinya lebih tinggi (Ahmad & Benjakul, 2011). Stabilitas emulsi fraksi gelatin kulit ikan nila (Gambar 4) juga tidak jauh berbeda dengan gelatin dari kulit ikan *zebra blenny* (*Salaria basilisca*) yang tertinggi 19,7 menit pada konsentrasi 0,5 % (Ktari et al., 2014).

Gambar 4 juga menunjukkan berat molekul gelatin berpengaruh pada sifat emulsi. Hal ini diketahui dari fraksi gelatin GAs dan GSi *retentate* 100 kD menghasilkan aktifitas dan stabilitas emulsi yang tinggi hampir menyamai bentuk *native*nya, sedangkan fraksi *permeate* 100 kD menghasilkan nilai terendah.



Keterangan / note :

- Native/Native* = Gelatin *native* dari kulit ikan nila (*O. niloticus*)/*Native gelatin from tilapia fish (O. niloticus) skin*
- Retentate 100 kD* = Fraksi gelatin dari kulit ikan nila (*O. niloticus*) yang tertahan dalam kantong dialisis MWCO 100 kD/ *Gelatin extract fraction from tilapia fish (O. niloticus) skin in dialysis bag MWCO 100 kD*
- Permeate 100 kD* = Fraksi ekstrak gelatin dari kulit ikan nila (*O. niloticus*) yang keluar dari kantong dialisis MWCO 100 kD/ *Gelatin extract fraction from tilapia fish (O. niloticus) skin which out from dialysis bag MWCO 100 kD*

Gambar 4. *Emulsion Activity Index (EAI) dan Emulsion Stability Index (ESI) fraksi gelatin kulit ikan nila (O. niloticus) dari proses asam asetat 0,10 M selama 2 jam (GAs) dan asam sitrat 0,05 M selama 1 jam (GSi).*

Figure 4. *Emulsion Activity Index (EAI) dan Emulsion Stability Index (ESI) of gelatin tilapia fish (O. niloticus) skin fraction from 0.10 M acetat acid processed for 2 hours (GAs) and 0.05 M citric acid processed for 1 hour (GSi).*

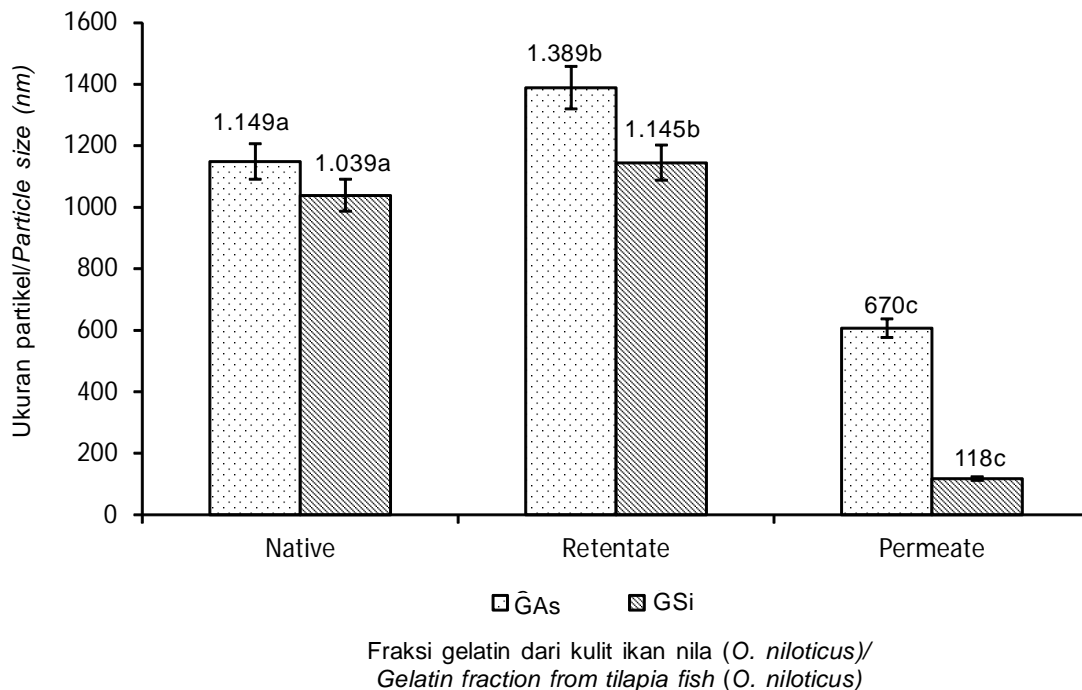
Fraksi gelatin GAs dan GSi *retentate* 100 kD memiliki distribusi berat molekul yang lebih besar mengandung sub unit α lebih banyak daripada fraksi *permeate* 100 kD. Fraksi gelatin GAs dan GSi *permeate* 100 kD memiliki berat molekul <100 kD (Gambar 1 dan 2) tidak ditemukan sub unit α . Gelatin yang masih dalam kondisi murni (*native*) mengandung beberapa untaian sub unit α dalam bentuk *folded*. Perlakuan suhu 40 °C selama proses fraksinasi dan pemekatan dialisis menyebabkan ikatan kovalen diantara sub unit α dalam molekul gelatin dapat terlepas. Hal ini menyebabkan struktur molekul gelatin α helix dalam bentuk *folded* terpecah menjadi *unfolding* (Ward & Corts, 1977). Molekul gelatin dengan sub unit α *helix* yang panjang dan lebih banyak bersifat non polar dapat membentuk lapisan membran antarmuka droplet emulsi yang lebih tebal dan kuat sehingga emulsi menjadi lebih stabil (Kaewruang et al., 2013).

Struktur molekul protein dalam bentuk *unfolding* berpengaruh pada sifat hidrofobisitas dan ikatan kovalennya sehingga dapat menyebabkan lebih mudah terlarut dalam larutan fase air. Selain itu daya elektrostatisnya juga menjadi lebih rendah karena

muatan ionik molekulnya menjadi berkurang (Dickines, 2017). Hal ini terlihat pada fraksi GAs dan GSi *permeate* 100 kD yang menunjukkan kestabilan emulsi yang rendah. Kestabilan emulsi juga dipengaruhi oleh kekuatan daya tarik menarik elektrostatis antar muatan ionik dalam molekul gelatin yang terserap pada lapisan antarmuka (*interface*). Gelatin dengan berat molekul rendah dengan kandungan sub unit α lebih sedikit atau tidak terdapat sub unit α tidak banyak mengandung asam amino. Hal ini menyebabkan kestabilan emulsi menjadi rendah karena kurang adanya muatan ionik pada lapisan antarmuka fase air dan minyak.

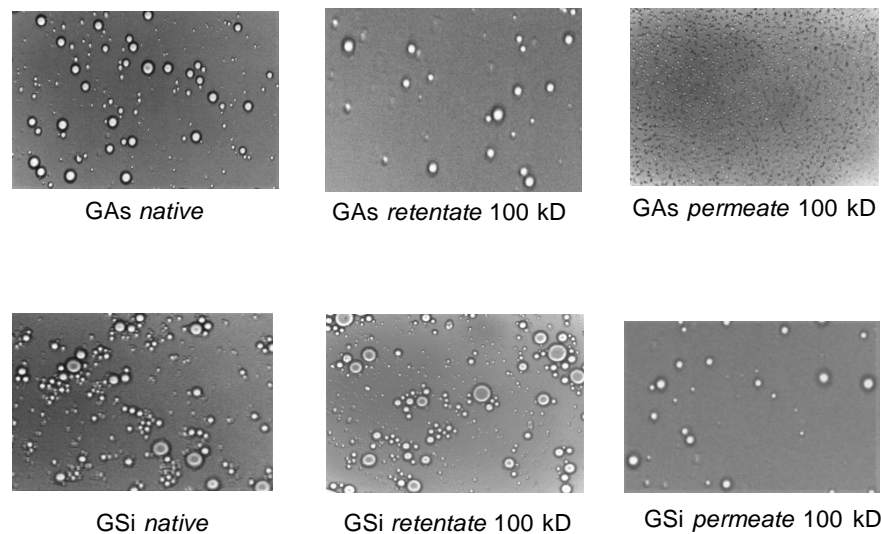
Ukuran Partikel Emulsi dan Mikrostruktur Emulsi

Ukuran partikel emulsi ditunjukkan dengan nilai rata-rata diameter droplet emulsi yang dihasilkan. Rata-rata diameter droplet emulsi dari gelatin GAs dan GSi *native* beserta masing-masing fraksinya pada konsentrasi 0,1% pada Gambar 5, dengan pengamatan visual emulsinya menggunakan *optic microscope* disajikan pada Gambar 6.



Gambar 5. Ukuran partikel emulsi gelatin GAs *native* dan GSi *native* dengan fraksi *retentate* 100 kd dan *permeate* 100 kD

Figure 5. Particle size emulsion of gelatin Gas *native* and GSi *native* with fraction of *retentate* 100 kD dan *permeate* 100 kD



Gambar 6. Pengamatan visual emulsi GAs *native* dan GSi *native* dan fraksi retentate 100 kD dan permeate 100 kD

Figure 6. Visual observation of gelatin Gas *native* and GSi *native* with fraction of retentate 100 kD and permeate 100 kD

Berat molekul gelatin GAs dan GSi *native* beserta masing-masing fraksinya berpengaruh nyata pada ukuran partikel emulsi yang dihasilkan ($p < 0.05$). Berdasarkan Gambar 5 diketahui fraksi GAs *retentate* 100 kD memiliki ukuran rata-rata diameter droplet yang paling besar (1389 nm) dan yang paling rendah fraksi GSi *permeate* (118 nm) 100 kD (118nm).

Ukuran droplet emulsi GAs *native* dan GSi *native* lebih rendah daripada fraksi GAs dan GSi *retentate* 100 kD sedangkan pada fraksi GAs dan GSi *permeate* 100 kD tidak banyak terbentuk emulsi karena kurang adanya muatan ion dalam molekul gelatin yang terserap pada permukaan droplet. Hal ini menunjukkan berat molekul gelatin dengan kandungan sub unit α dapat mempengaruhi dalam pembentukan emulsi. Berat molekul gelatin yang rendah mengandung sub unit α yang terdiri dari asam amino yang lebih rendah sehingga muatan ion pada lapisan antar muka (*interface*) droplet emulsi menjadi sedikit. Hal ini menyebabkan aktifitas pembentukan emulsi yang terbentuk dari gelatin dengan berat molekul rendah menjadi lebih sedikit dan pembentukan emulsi menjadi kurang stabil (Gambar 4).

Berdasarkan Gambar 6 dapat diketahui ukuran droplet emulsi dari 0,1% GAs *native* (1149 nm) dan GSi *native* (1039 nm) beserta fraksi *retentate* 100 kD (1389 nm dan 1145 nm) dan *permeate* 100 kD (670 nm dan 118 nm), sehingga emulsi tersebut termasuk dalam makroemulsi. Makroemulsi memiliki ukuran droplet berkisar antara 0,1-100 μ m, sedangkan mikroemulsi 10-100 nm (Bouyer, Mekhloufi, Rosilio,

Grossiord, & Agnely, 2012). Ukuran droplet emulsi gelatin GAs dan GSi beserta fraksinya tersebut lebih besar daripada ukuran droplet emulsi dari gelatin ikan tipe A dengan berat molekul ≈ 55 kD dan ≈ 120 kD. Surh et.al., (2006) menyatakan ukuran rata-rata diameter droplet emulsi dari gelatin ikan tipe A dengan berat molekul ≈ 55 kD dan ≈ 120 kD sebesar ≈ 0.35 μ m dan ≈ 0.71 μ m. Namun demikian, emulsi yang terbentuk dari gelatin GAs dan GSi *native* beserta fraksinya tersebut diatas memiliki stabilitas emulsi yang tinggi mencapai 22,62 menit pada konsentrasi 0,1% (Gambar 4) dengan ukuran partikel driplet > 200 nm (Gambar 5), kecuali pada fraksi GSi *permeate* 100 kD. Tavernier et al. (2016) menyatakan ukuran partikel emulsi gelatin ≈ 200 nm menunjukkan stabilitas emulsi yang tinggi pada kondisi pH yang jauh dari titik isoelektrik sehingga dapat mencegah terjadinya *coalescence*. Karakteristik emulsi tersebut juga menunjukkan bahwa fraksi gelatin GAs dan GSi dapat diaplikasikan pada produk pangan emulsi minyak dalam air seperti *ice cream*, *whipping cream* dan *salad dressing* (Hasenhuettl dan Hartel, 2008).

pH Emulsi

Nilai pH emulsi dari GAs *native* dan GSi *native* beserta fraksinya dapat dilihat pada Tabel 2. Dari Tabel 2 diketahui nilai pH fraksi GAs *native* dan GSi *native* dengan fraksi *retentate* 100 kD memiliki nilai pH yang lebih rendah daripada fraksi *permeate* 100 kD.

Nilai pH emulsi gelatin yang terbentuk dipengaruhi oleh pH gelatin yang digunakan. Gelatin kulit ikan nila

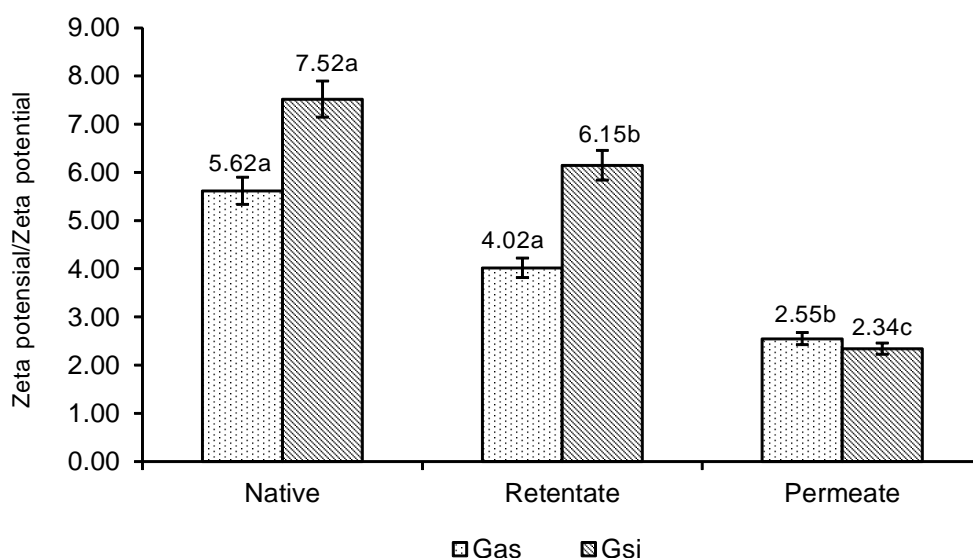
Tabel 1. Nilai pH emulsi gelatin GAs *native* dan GSi *native* dengan fraksi retentate 100 kD dan retentate fraksi permeate 100 kD

Table 1. pH value of gelatin Gas *native* and GSi *native* with fraction of retentate 100 kD and permeate 100 kD

Sampel/Sample	pH pH
GAs <i>native</i>	5.50 ± 0.10 ^a
GAs <i>retentate</i> 100 kD	5.54 ± 0.06 ^a
GAs <i>permeate</i> 100 kD	6.44 ± 0.16 ^b
GSi <i>native</i>	4.03 ± 0.04 ^a
GSi <i>retentate</i> 100 kD	3.98 ± 0.04 ^a
GSi <i>permeate</i> 100 kD	4.83 ± 0.04 ^b

yang diisolasi dari proses asam sitrat 0.05 M selama 1 jam (GSi) memiliki nilai pH yang lebih rendah daripada proses asam asetat 0.10 M selama 2 jam (GAs). Asam sitrat memiliki daya ionisasi yang lebih besar daripada asam asetat karena memiliki tiga gugus asam karboksilat (Niu et al., 2013). Selain itu, hasil pengamatan visual emulsi dengan alat foto *mikroskop optik* (Gambar 6) menunjukkan emulsi dari gelatin GAs dan GSi *native* memiliki distribusi ukuran droplet yang lebih homogen daripada fraksi *retentate* 100 kD dan *permeate* 100 kD. Pada fraksi GAs dan

GSi *permeate* 100 kD tidak terlihat adanya droplet emulsi yang seragam bentuknya. Hal ini disebabkan kurang adanya daya tarik ionik dalam larutan gelatin dengan berat molekul rendah pada konsentrasi yang rendah. Nilai pH fraksi GAs permeate 100 kD sebesar 6,44 paling besar diantara nilai pH dari fraksi lainnya. Kelarutan protein akan menurun pada nilai pH yang mendekati nilai titik isoelektrik, dimana nilai titik isoelektrik gelatin GAs dan GSi berada pada pH 8,5 (Suryanti et al., 2016).



Fraksi gelatin dari kulit ikan nila (*O. niloticus*)/
Gelatin fraction from tilapia fish (*O. niloticus*) skin

Gambar 7. Zeta potensial emulsi gelatin GAs dan GSi *native* dan fraksi *retentate* 100 kD dan *permeate* 100 kD.
Figure 7. Zeta potential of gelatin Gas *native* and GSi *native* with fraction of retentate 100 kD and permeate 100 kD.

Zeta Potensial

Zeta potensial adalah besarnya muatan elektron pada permukaan droplet partikel dalam suatu sistem emulsi. Zeta potensial sangat erat berkaitan dengan nilai pH emulsi dan titik isoelektrik gelatin yang digunakan dalam pembentukan emulsi. Semakin jauh nilai pH emulsi gelatin yang terbentuk dari titik isoelektriknya, maka semakin besar muatan elektron pada permukaan droplet partikel emulsi. Hal ini menunjukkan pembentukan emulsi yang stabil karena terjadi interaksi antara muatan ion gelatin dalam air fase air dan minyak dalam sistem emulsi.

Nilai zeta potensial emulsi yang terbentuk dari GAS *native* dan GSi *native* beserta fraksinya yaitu fraksi retentate 100 kD dan permeate 100 kD dapat dilihat pada Gambar 7. Pada gambar ini terlihat nilai zeta potensial pada gelatin GAS *native* dan GSi *native* beserta fraksi *retentate* 100 kD dan *permeate* 100 kD bernilai positif. Zeta potensial tertinggi pada gelatin GSi *native* yaitu +7,52 sedangkan nilai zeta potensial terendah pada fraksi GSi *permeate* 100 kD sebesar +2,34 yang tidak berbeda jauh dengan fraksi GAS *permeate* 100 kD +2,55.

Nilai zeta potensial yang rendah menyebabkan kestabilan emulsi menjadi rendah karena daya tarik antar muatan ion dalam molekul gelatin dengan fase minyak dan air rendah yang dapat menyebabkan rendahnya kemampuan dalam pembentukan droplet emulsi (Gambar 5). Selain itu, gelatin GSi *native* beserta fraksi *retentate* 100 kD dan *permeate* 100 kD lebih banyak bermuatan positif daripada GAS *native* dan fraksinya. Asam sitrat memiliki beberapa grup molekul terionisasi yang reaktif terdiri dari tiga grup karboksilat ($pK_{a1} = 3,13$; $pK_{a2} = 4,76$; $pK_{a3} = 6,39$) dan satu grup OH (Vancik, 2014), sehingga dapat memecah struktur molekul kolagen *triple helix* lebih banyak (Niu et al., 2013) dan dapat menghasilkan molekul gelatin dengan muatan positif yang lebih banyak.

KESIMPULAN

Fraksinasi gelatin dari kulit ikan nila (*Oreochromis niloticus*) yang diperoleh dari proses asam asetat 0,10 M dan asam sitrat 0,05 M dengan menggunakan kantong dialisis MWCO 100 kD dapat diperoleh fraksi distribusi berat molekul 13,6-218,87 kD dan 15,27-61,1 kD (dari proses asam asetat) dan 107,5-142,23 kD dan 12,5-82,9 kD (dari proses asam sitrat). Gugus fungsional molekul dari keempat fraksi gelatin tersebut terdiri dari amida I (1648 cm^{-1}), amida II (1452 cm^{-1}) dan amida III (1089 cm^{-1}). Karakteristik emulsi yang meliputi sifat emulsi (aktifitas dan stabilitas emulsi) semakin meningkat dengan semakin meningkatnya

berat molekul. Nilai zeta potensial droplet emulsi dari fraksi gelatin kulit ikan nila dan *nativenya* bermuatan positif, dimana gelatin kulit ikan nila dari proses asam sitrat lebih banyak bermuatan ion positif daripada proses asam asetat. Emulsi yang terbentuk dari fraksi GAS dan GSi pada konsentrasi 0,1% memiliki ukuran droplet $>100\text{ nm}$ sehingga termasuk dalam makroemulsi. Makroemulsi dari fraksi GAS dan GSi memiliki stabilitas yang tinggi mencapai 22,62 menit sehingga dapat diaplikasikan pada produk pangan seperti *ice cream*, *whipping cream* dan *salad dressing*.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad, M. & Benjakul, S. (2011). Characteristics of gelatin from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*) as influenced by acid pretreatment and extraction time. *Food Hydrocolloids*, 25, 381-388. doi:10.1016/j.foodhyd.2010.07.004.
- Anonim. (2012). GMIA. *Gelatin Handbook*. Gelatin Manufacture Institute of America. Amerika.
- Bouyer, E., Mekhloufi, G., Rosilio, V., Grossiord, J. L., & Agnely, F. (2012). Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: Alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field. *International Journal of Pharmaceutics*, 436, 359-378.
- Biorad Laboratories. (2016). *A guide to Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Detection*. California. USA. Life Science Group. Retrieved from http://www.biorad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6040.
- Chen, S., Tang, L., Su, W., Weng, W., Osako, K., & Tanaka, M. (2015). Separation and characterization of alpha-chain subunits from tilapia (*Tilapia zillii*) skin gelatin using ultraviltration. *Food Chemistry*, 188, (350-35) 6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.084>.
- Dickines, E. 2017. Biopolymer-based particles as stabilizing agents for emulsions and Foams. *Food Hydrocolloids*, 68, 219-231.
- Eysturskarð, J., Haug, I. J., Elharfaoui, N., Djabourov, M., & Draget, K. I. (2012). Structural and mechanical properties of ūsh gelatin as a function of extraction conditions. *Food Hydrocolloids*, 23, 1702-1711. doi:10.1016/j.foodhyd.2009.01.008.
- Gao, Z., Zhao, J., Huang, Y., Yao, X., Zhang, K., Fang, Y., Nishinari, K., Phillips, G., Jiang, F. & Yang, H. (2017). Edible Pickering emulsion stabilized by protein fibrils. Part 1: Effects of pH and fibrils concentration. *LWT - Food Science and Technology*, 76, 1-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2016.10.038>.
- Hattrem, M. N., Molnes, S., Haug, I.J. & Draget, K.J. (2015). Interfacial and rheological properties of gelatin based solid emulsions prepared with acid or alkali pretreated gelatins. *Food Hydrocolloids*, 43 , 700-707. doi:10.1016/j.foodhyd.2010.08.007.
- Hasenhuettl, G. L., & Hartel, R. W. (2008). *Food emulsifier and their application*. Springer Science.

- Kaewruang, P., Benjakul, S., & Prodpran, T. (2013). Molecular and functional properties of gelatin from the skin of unicorn leatherjacket as affected by extracting temperatures. *Food Chemistry*, 138, 1431-1437. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.114>.
- Ktari, N., Mourad, I., Rim, N., Imen, L., Hanen, B. A., Barkia, A. & Moncef, N. (2014). Characteristics and functional properties of gelatin from zebra blenny (*Salaria basilisca*) skin. *LWT - Food Science and Technology*, 58, 602-608. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2014.03.036>.
- Liu, H., Wong, B., Barrow, C.J. & Adhikari, B. (2014). Relating the variation of secondary structure of gelatin at fish oil–water interface to adsorption kinetics. dynamic interfacial tension and emulsion stability. *Food Chemistry*, 143, 484-491. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.130>.
- McClement D. J. (2005). *Food Emulsions. Principles. Practices. and Techniques*. Second Edition. CRC Press. Washington DC.
- Montoya, M. H. U., Ortega, H. S., Moroyoqui, F. J. C., Sández, O. R., Atomea, M. P. & Braue, J. M. E. 2011. Giant squid skin gelatin: Chemical composition and biophysical characterization. *Food Research International*, 44, 3243-3249. doi:10.1016/j.foodres.2011.08.018.
- Mulder, M. 1996. *Basic principle of the membrane technology*. Kluwer academic publisher. London.
- Niu, L., Zhou, X., Yuan, C., Bai, Y., Yang, F. & Huang, Y. (2013). Characterization of tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin gelatin extracted with alkaline and different acid pretreatments. *Food Hydrocolloids*, 33 (336-341). <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.04.014>.
- Pearce, K. N. & Kinsella, J. E. (1978). Emulsifying Properties of Proteins: Evaluation of a Turbidimetric Technique. *Journal of Agric. Food Chem.*, 26(3), 0021-8561/78/1426-0716\$01 .OO/O
- Phillip, G. O. & Williams, P. A. (2009). *Handbook of Hydrocolloids*. Second edition. CRC Press. Washington. DC.
- Surh, J., Decker, E. A., & McClement, D.J. (2006). Properties and stability of oil-in-water emulsions stabilized by fish gelatin. *Food Hydrocolloids*, 20 (596-606). doi:10.1016/j.foodhyd.2005.06.002
- Suryanti, Indrati, R., Irianto, H.E., & Marseno, D.W. (2016). Comparison Study on the Extraction of Gelatin from Nila Fish (*Oreochromis niloticus*) Skin Using Acetic Acid and Citric Acid. *Pakistan Journal of Nutrition*, 15 (8), 777-783. ISSN 1680-5194.
- Ward, A. G. & Courts, A. (1977). *The Science and Technology of Gelatin*. Academic Press. London.
- Zarai, Z., Balti, R., Mejdouba, H., Gargouri, Y., & Sayari, A. (2012). Process for extracting gelatin from marine snail (*Hexaplex trunculus*) : Chemical composition and functional properties. *Process Biochemistry*, 47, 1779-1784. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2012.06.007>.