

## KOMUNIKASI RINGKAS

### EKSTRAKSI DAN KARAKTERISASI KOLAGEN DARI KULIT IKAN NILA HITAM (*Oreochromis niloticus*)

#### *Extraction and Characterization of Collagen from Black Tylapia Skin (Oreochromis niloticus)*

A.B. Naro Putra<sup>1\*</sup>, Latif Sahubawa<sup>1</sup>, dan Nurfitri Ekantari<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Jurusan Perikanan, Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada.  
Jl. Flora Bulaksumur DIY Yogyakarta

\* Korespondensi Penulis: latifsahubawa2004@yahoo.com

Diterima: 12 Mei 2011, Disetujui: 21 Oktober 2013

#### ABSTRAK

Kulit ikan nila hitam (*Oreochromis niloticus*) dapat diekstraksi menjadi kolagen dan turunannya sebagai salah alternatif peningkatan nilai tambah limbah industri perikanan. Ekstraksi kolagen dari sampel kulit ikan nila hitam menggunakan asam asetat (metode asam) dan dipresipitasi dengan larutan garam dapur (NaCl) 0,9 M. Untuk meningkatkan optimasi isolasi kolagen (berdasarkan jumlah rendemen), kulit ikan nila hitam diekstraksi dengan 3 perlakuan konsentrasi asam asetat, masing-masing: 0,25 M; 0,50 M; dan 0,75 M pada selang waktu 16 dan 48 jam. Dari hasil pengujian diketahui bahwa perlakuan interaksi konsentrasi asam asetat dan waktu ekstraksi tidak berpengaruh nyata ( $p>0,05$ ) terhadap pembentukan rendemen kolagen pada tingkat signifikansi 95%. Perlakuan asam asetat 0,75 M pada selang waktu 16 jam menghasilkan rendemen terbesar (5,96%), dengan suhu denaturasi kolagen mencapai 35,75 °C; serta komposisi asam amino: glisin 5395,82 ppm (52,99%), alanin 2979,15 ppm (22,08%), dan asam glutamat 1684,42 ppm (7,45%). Berdasarkan analisis SDS-PAGE, diketahui bahwa kolagen dari sampel kulit ikan nila hitam mengandung ikatan rantai- $\alpha$  dan rantai- $\beta$  sebagai kolagen tipe-I.

**KATA KUNCI:** asam asetat, kolagen, kulit nila hitam, ekstraksi, karakterisasi

#### ABSTRACT

*Skin of black tylopia (Oreochromis niloticus) can be processed into the collagen and its derivatives, as a alternative to increase value-addition of fisheries industry wastes. Skin of black tylopia was extracted using acetic acid and precipitated with 0.9 M NaCl. To establish the optimum conditions for the isolation of high yield collagen by acidic method, the skin was treated with various concentrations of the acetic acid, each: 0.25 M, 0.50 M, and 0.75 M at time intervals of 16 and 48 hours. It seemed that the interaction of those treatments did not significantly affect the yield of the collagen ( $p>0.05$ ), but the skin extracted with 0.75 M acetic acid at 16 hours has the highest yield of acid soluble collagen (ASC) (5.96%), with denaturation temperature of ASC was 35.75°C. Amino acid composition consisted of: glycine 5395.82 ppm (52.99%), alanine 2979.15 ppm (22.08%), and glutamic acid 1684.42 ppm (7.45%). The analysis of SDS-PAGE showed that the collagen black tylopia skin contained  $\alpha$ -chain and  $\beta$ -chain bonds as a collagen-type I.*

**KEYWORDS:** acetic acid, collagen, black tylopia skin, extraction, characterization

#### PENDAHULUAN

Penggunaan kolagen dalam industri pangan dan nonpangan pada umumnya bersumber dari jaringan kulit hewan darat (terutama sapi dan babi) sebagai bahan baku potensial. Dalam pemanfaatannya, kolagen banyak digunakan pada dunia kecantikan dan kesehatan, namun ternyata jenis bahan baku ini dapat

menimbulkan dampak buruk terhadap kesehatan manusia. Menurut Yamaguchi (2002), lebih-kurang 10% dari total konsumen kolagen di dunia terjangkit penyakit *bovine spongiform encephalopathy* (BSE) serta penyakit kuku dan mulut setelah menggunakan kolagen yang bersumber dari jaringan kulit sapi dan babi. Permasalahan ini memberikan peluang besar pada pemanfaatan kulit ikan nila hitam khususnya

dan kulit ikan umumnya sebagai sumber kolagen alternatif potensial, yang diharapkan diproduksi secara komersial. Pemanfaatan limbah kulit ikan nila hitam sebagai bahan baku kolagen merupakan salah satu alternatif peningkatan nilai tambah (*value-added*) limbah industri perikanan, sekaligus mengurangi dampak negatif (pencemaran) terhadap lingkungan hidup.

Kolagen diketahui mempunyai banyak manfaat di dunia medis dan farmasi. Aplikasi kolagen antara lain: penanganan penderita hipertensi, permasalahan urinari, sakit yang berkaitan dengan *osteoarthritis*, rekayasa jaringan untuk implantasi pada manusia, dan penghambatan penyakit *angiogenic*, seperti komplikasi diabetes, obesitas, dan *arthritis* (Rehn *et al.*, 2001). Kolagen juga dapat diaplikasikan dalam bidang pangan (*edible casing*), kosmetik (krim kulit, shampo, produk-produk perawatan rambut, cat kuku), dan medis (perbanyakkan plasma, plasma pemekar, agen hemostatik, material benang bedah, perbaikan katup prostensis, perbaikan selaput mata, hemodialisis, tulang buatan, pebentukan oksigen membram, dan pemulihan operasi organ-organ yang rusak (esofagus, trakea) (Chvapil, 1979).

Penelitian isolasi rendemen kolagen dari beberapa spesies ikan dan bagian tubuh lainnya telah dilakukan. Ekstraksi kolagen kulit ikan *perch* Nil (usia muda) didapatkan rendemen sebesar 63,1% dan 58,7% pada usia dewasa; pada makarel *chub*, hiu *bullhead*, dan kakap Jepang didapatkan rendemen kolagen masing-masing: 49,8% ; 50,1% ; dan 51,4% (Jongjareonak *et al.*, 2004). Pada ikan cod dan cod *Baltic* didapatkan kolagen masing-masing: 71,2% dan 74,4% (Sadowska, *et al.* 2003). Sedangkan dari kulit sotong, diperoleh *Acid Soluble Collagen* (ASC) sebesar 2% dan *Pepsin Soluble Collagen* (PSC) sebesar 35% (Nagai *et al.*, 2001). Perbedaan spesies, habitat dan perlakuan pada proses ekstraksi sangat berpengaruh pada rendemen, karakter, dan komposisi molekul kolagen. Penelitian tentang kolagen dari spesies ikan domestik masih sangat jarang dilakukan, sehingga data terkait belum mencukupi.

Penelitian tentang isolasi kolagen yang berasal dari spesies ikan air tawar yang hidup didaerah tropis jarang dilakukan. Ikan nila hitam merupakan salah satu spesies ikan air tawar yang hidup didaerah tropis. Berdasarkan latar belakang diatas dan sebagai upaya untuk memenuhi kebutuhan industri farmasi dari sumber kolagen yang aman, berkualitas dan dapat diterima semua kalangan, maka perlu dilakukan pengkajian terhadap potensi kolagen kulit ikan umumnya, dan kulit ikan nila hitam khususnya. Penelitian bertujuan untuk mempeleajari pengaruh konsentrasi larutan asam asetat dan lawa ekstraksi terhadap mutu kolagen dari limbah kulit nila hitam,

sekaligus mencoba mengkaji sumber kolagen potensial dan berkualitas, serta aman dan halal untuk konsumen, sebagai alternatif pengganti kolagen dari jaringan babi dan sapi.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan dan Alat

Bahan baku utama penelitian adalah kulit ikan nila hitam yang telah dikeringkan, didapatkan dari PT. Aquafarm Surakarta, Jawa Tengah. Bahan-bahan kimia untuk analisis antara lain: natrium hidoksida (NaOH), aquades, asam asetat ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), natrium klorida (NaCl), acrylamide, amonium persulfat (APS), *coomassie blue* R-250, asam etilendiamintetra-asetat, garam dinatrium ( $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), gliserol ( $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ ), glisin, asam hidroklorat (HCl), *â-mercaptoetanol*, metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ), *protein molecular weight standards* (e.g. *BioRad* 161-0318, *prestained SDS-PAGE standards broad range*, 209-7 kD), *sodium dodecyl sulfate* (SDS, *dodecyl sulfate, sodium salt*), *N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine* (TEMED), *tris base*, asam borat ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ), *bromocresol green*, etanol (95%), asam hidroklorat pekat (HCl), *methyl red*, asam sulfat pekat ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), *kjeldahl digestion tablets*: kalium sulfat ( $\text{K}_2\text{SO}_4$ ), *cupric sulfate* ( $\text{CuSO}_4$ ), titanium dioksida ( $\text{TiO}_2$ ); *tris hidroksimetil aminomethane* (THAM), *petroleum eter*, fenol,  $\text{N}_2$  air deionisasi, trimetilamin, fenilisotiosianat (PITC), *buffer fosfat* pH 7,4.

Peralatan yang digunakan terdiri atas: pisau *stainless steel*, talenan, wadah kaca, wadah plastik, neraca analitik, kertas pH, pH meter, pengaduk, gelas ukur, alat sentifugasi, viscometer, tabung dialisis, *protein marker*, *soxhlet extractor*, tabung digesti, labu erlenmeyer, kertas timbang, spatula, sistem distilasi dan digesti Kjeldahl, eksikator, oven, cawan, pipet, ember, toples, *magnetic stirrer*, *cold storage*, *amino acid analyzer*, penjepit, kain saring dakron, dan ayakan plastik.

### Metode

#### Prosedur Pengolahan Kolagen

Diagram alir proses pengolahan kolagen dari sampel kulit ikan nila hitam mengikuti langkah-langkah seperti pada Gambar 1. Secara garis besar, proses pengolahan kolagen terdiri atas 6 (enam) tahap yakni: (1) uji proksimat (kadar air, protein, lemak dan abu) ; (2) Preparasi sampel sebagai tahap awal memulai proses ekstraksi ; (3) Penghilangan proten non kolagen dengan larutan NaOH 0,1M ; (4) Proses ekstraksi kolagen ; (5) Permurnian (dialisis) dan liofilisasi kolagen; dan (6) Karakterisasi kolagen.

Penjelasan masing-masing tahap tersebut dapat dilihat pada uraian berikut.

### Analisis Proksimat

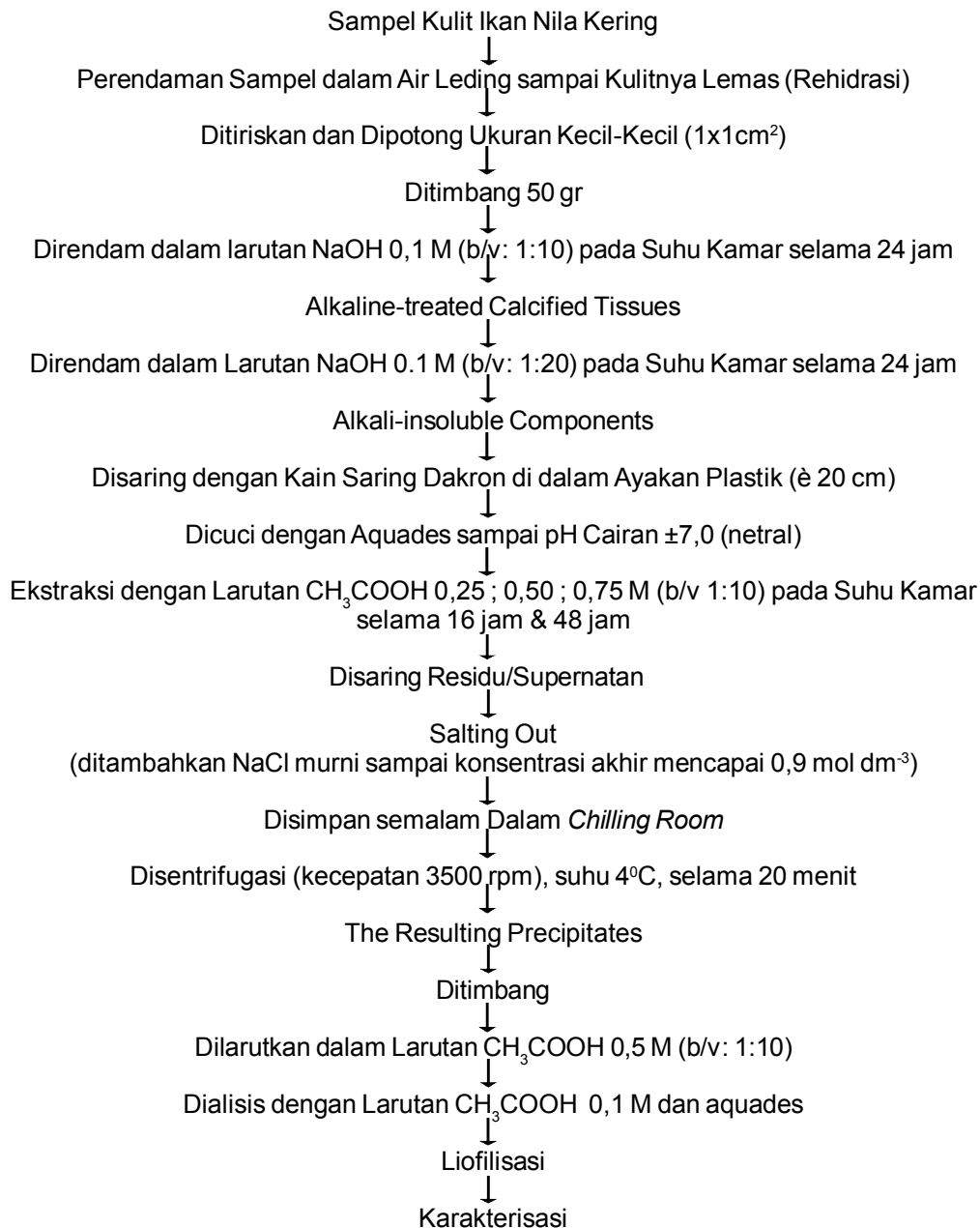
Sampel kulit nila hitam kering diuji kadar protein, kadar air, kadar abu, dan kadar lemak (Nielson *et al.*, 2003).

### Rendemen dan Isolasi Kolagen

Proses isolasi kolagen kulit ikan nila hitam menggunakan metode Ogawa *et al.* (2004) dengan

modifikasi. Semua prosedur isolasi kolagen dilakukan pada suhu kamar, kecuali untuk sentrifugasi (4°C), mengikuti tahap-tahap berikut.

- Penyiapan sampel kulit ikan nila hitam kering ukuran 1cm x 1cm. Penghilangan protein non-kolagen dengan cara merendaman sampel dalam larutan NaOH 0,1 M selama 24 jam dengan perbandingan bobot kulit dan volume larutan 1:20.
- Pencucian sampel dengan aquades hingga pH air cucian mendekati 7 (netral).
- Proses ekstraksi kolagen menggunakan perlakuan larutan CH<sub>3</sub>COOH konsentrasi 0,25 M; 0,50 M dan



Gambar 1. Diagram alir pengolahan kolagen dari kulit ikan nila hitam.  
Figure 1. Flowchart of the collagen processing from black tilapia skin.

0,75 M (b/v 1:10) dengan lama waktu inkubasi 16 dan 48 jam. Perlakuan yang menghasilkan rendemen kolagen terbesar, akan dipakai untuk analisis lanjutan (karakterisasi).

- d. Hasil ekstraksi disaring dengan kain saring dakron dalam ayakan plastik untuk memisahkan residu dan ekstrak (supernatan). Supernatan dipresipitasi dengan cara menambahkan NaCl sampai konsentrasi akhir larutan mencapai  $0,9 \text{ mol dm}^{-3}$  hingga didapatkan presipitat kolagen (*salting-out*).
- e. Presipitat dibiarkan selama 24 jam dalam kondisi dingin, kemudian disentrifus pada kecepatan 3500 rpm dan suhu  $4^{\circ}\text{C}$  selama 20 menit. Hasil sentrifus didialisis dengan cara melarutkan kolagen di dalam larutan asam asetat 0,5 M (b/v: 1:10), kemudian dimasukkan ke dalam membran selofan.
- f. Membran yang berisi kolagen direndam dalam larutan asam asetat 0,1 M (diulangi 3 kali dengan larutan asam asetat yang baru). Setelah dua kali dilakukan penggantian larutan asam asetat, membran yang berisi kolagen direndam di dalam aquades yang diganti setiap 3 jam sampai pH aquades menjadi 5 atau lebih. Kolagen pascadialisis, diliofilisasi (*freeze drying*) selama 12 jam dalam wadah-wadah kecil terpisah yang mudah dikeringkan.

### Pengukuran Viskositas dan Suhu Denaturasi

Viskositas dan suhu denaturasi dianalisis dengan metode Ogawa *et al.* (2004), dengan menggunakan alat *Cannon-Fenske Viscometer*, mengikuti persamaan 1.

$$\zeta_{sp} = (t - t_0) / t_0 \quad \text{Persamaan (1)}$$

Keterangan:

- $\zeta_{sp}$  = viskositas spesifik larutan  
 $t$  = waktu alir larutan kolagen (detik)  
 $t_0$  = waktu alir pelarut (detik)

Pengukuran suhu denaturasi kolagen dilakukan dengan cara: (a) mengalirkan larutan kolagen 8 ml, 0,02 g/dl (20 mg dalam 100 ml larutan asam asetat) melalui kapiler viskometer pada suhu  $30 - 42^{\circ}\text{C}$ , (b) amati viskositas dengan mengukur waktu alir pada suhu yang sama, (c) kurva denaturasi termal larutan kolagen dibentuk dengan memplotkan viskositas tereduksi  $\zeta_{sp}/c$  melawan suhu, (d) titik denaturasi ( $T_d$ -V) diekspresikan sebagai suhu pertengahan antara garis terekstrapolasi dari kolagen asal dengan kolagen yang sepenuhnya terdenaturasi pada plot  $\zeta_{sp}/c$  versus suhu.

### Analisis Komposisi Asam Amino (Metode Pico.Tag: Bidlingmeyer *at al*, 1984)

Analisis komposisi asam amino dilakukan dengan terlebih dahulu memotong rantai kolagen menjadi residu asam amino, mengikuti langkah-langkah berikut.

- a. Menyiapkan 5 gram sampel kulit ikan, masukkan ke dalam 20 ml HCl 6 N, dan dihomogenkan.
- b. Homogenat dimasukkan ke dalam autoklaf pada suhu  $110^{\circ}\text{C}$  dan disimpan selama 12 jam sampai terjadi keseimbangan suhu autoklaf dan ruang.
- c. Setelah suhu seimbang, homogenat dinetralkan dengan larutan NaOH 6 N, tambahkan pula 2,5 ml Pb asetat dan 1 ml asam oksalat, dan kemudian disaring dengan *rillex*  $0,45 \mu\text{m}$ . Hasil saringan yang terbentuk diinjeksi ke dalam alat HPLC untuk dilihat
- d. Menyiapkan alat HPLC merk Beckman menggunakan metode Sudarmadji (1996) mengikuti aturan sebagai berikut.
  - 1). Pengisian kolom ukuran  $4,6 \times 250 \text{ mm}$  dengan bahan ODS (*Octa Dodeyl Silane* atau  $\text{C}_{18}$ ). Untuk menjaga kondisi bahan, kolom utama disambungkan dengan satu kolom pelindung dengan bahan yang sama namun lebih pendek.
  - 2). Pengisian kolom pelindung  $4,6 \times 45 \text{ mm}$  dengan bahan ODS berukuran 5 mikron.
  - 3). Siapkan *ultrasphere* dengan pendukung silika.
  - 4). Cairan pendorong (eluen) yang digunakan yaitu campuran metanol : larutan asetat dengan perbandingan 85:15. Perbandingan asetat dan akuades sebesar 1:100. Kecepatan alir eluen 1 ml/menit, dengan panjang gelombang detektor ultraviolet 267 nm.

Analisis komposisi asam amino hanya mencakup 3 jenis (glisin, alanin, dan asam glutamat) tanpa prolin dan hidrosiprolin karena tidak tersedia *protein molecular weight standards* dari ke dua jenis asam amino tersebut.

### Analisis Tipe Kolagen (Metode Elektroforesis: Sambrook & Russel, 2001)

Tipe kolagen dianalisis menggunakan *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) yang mengacu pada buku panduan Sambrook dan Russel (2001), sebagai berikut.

- a. Menyiapkan SDS-PAGE dengan cara preparasi 10  $\mu\text{g}$  sampel bubuk kolagen yang dilarutkan dalam 200  $\mu\text{l}$  aquades, kemudian diaduk dengan *magnetic stirrer*. Sampel bubuk kolagen yang terlarut dicampur pada perbandingan 1:1 (v/v) dengan 10% SDS.
- b. Menyiapkan campuran gel SDS-PAGE dengan konsentrasi 8% untuk dimasukkan ke dalam

lempeng kaca. Sampel beserta *marker* protein yang telah disiapkan, diinjeksikan ke dalam sumuran yang tersedia dengan cara memasukan sebanyak 10 µl sampel secara perlahan, diikuti dengan *marker* sebanyak 1 µl. *Marker* rainbow digunakan untuk memperkirakan bobot molekul protein.

- c. Elektroforesis dioperasikan pada 10-20 mA selama 30-60 menit sampai membentuk gel, kemudian diwarnai selama 8 jam dengan bahan *Coomassie blue R-250* 0,05% (b/v) dalam metanol 15% (v/v) dan asam asetat 5% (v/v).
- d. Penghilangan warna gel menggunakan metanol 30% (v/v) dan asam asetat 10% (v/v).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Proksimat (%)

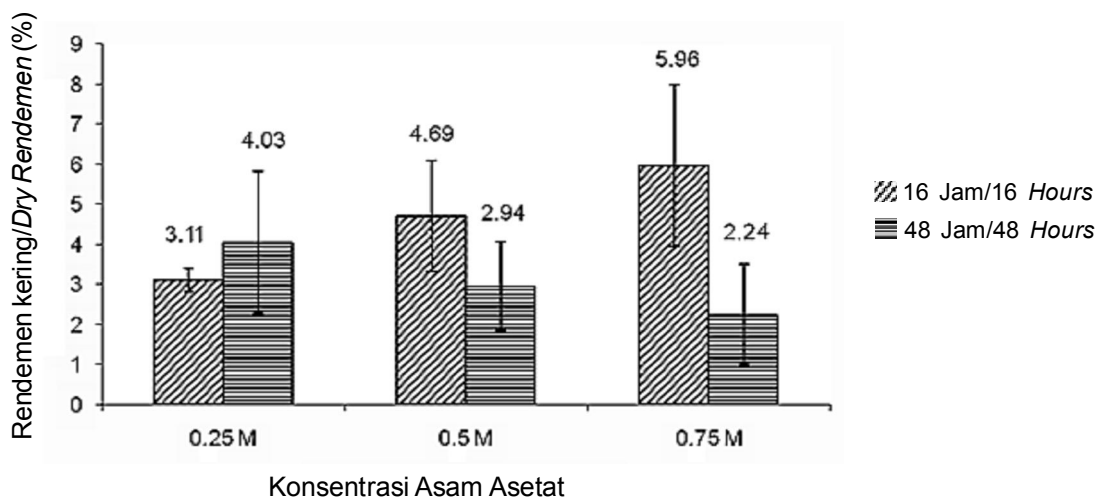
Hasil uji proksimat dari sampel kulit ikan nila hitam kering adalah: kadar protein 47,43%; air 23,74%; lemak 1,68%; dan abu 3,01%. Menurut Sadowska et al. (2003), kandungan kolagen dari sampel kulit ikan adalah sebesar 21,50% (berat basah) dan 71,20% (berat kering). Kadar protein dari sampel kulit ikan nila hitam sebesar 47,43% menunjukkan bahwa kulit nila hitam memiliki kualitas yang baik untuk dijadikan sebagai bahan baku kolagen dalam industri sebagai alternatif pengganti jaringan kulit babi dan sapi.

### Rendemen

Hasil analisis sidik ragam menunjukkan bahwa interaksi perlakuan konsentrasi asam asetat dan

waktu ekstraksi tidak berpengaruh nyata ( $p > 0,05$ ) terhadap produksi rendemen bubuk kolagen pada tingkat signifikansi 95%. Berdasarkan pengujian, dihasilkan rendemen bubuk kolagen dari sampel kulit ikan nila hitam berkisar antara 2,24% - 5,96%. Persentase rendemen kolagen yang diekstraksi dengan asam asetat konsentrasi 0,25M; 0,50M; 0,75M pada selang waktu 16 dan 48 jam diperlihatkan pada Gambar 2. Berdasarkan Gambar 2, terlihat bahwa proses ekstraksi sampel kulit ikan nila hitam yang menggunakan konsentrasi asam asetat 0,75M (tertinggi) pada selang waktu 16 jam (terpendek) menghasilkan persentase rendemen kolagen yang lebih besar (5,96%) dibandingkan waktu ekstraksi yang lama (48 jam), yakni 2,24%. Sama halnya dengan penggunaan konsentrasi asam asetat rendah (0,25M dan 0,50M) pada selang waktu 48 jam, artinya makin tinggi konsentrasi larutan asam asetat yang digunakan, makin banyak kolagen yang dihasilkan. Sebaliknya makin lama waktu ekstraksi makin sedikit kolagen yang dihasilkan. Hal ini menunjukkan bahwa faktor konsentrasi larutan asam asetat memberikan pengaruh signifikan terhadap ekstraksi protein kolagen.

Dibandingkan dengan rendemen kering kolagen dari sampel kulit dan sisik ikan lainnya, yakni: *Cuttlefish skin* (2.0%), *Sardine scale* (5.0%), dan *Carper scale* (7.0%), serta *Baramundi skin* (9.0%) (rendemen basah) yang diekstraksi dengan metode asam (ASC) ternyata kolagen kulit ikan nila hitam yang diekstraksi dengan metode yang sama (asam asetat 0,75M) menghasilkan rendemen kering yang cukup besar (5,96%). Meskipun demikian, kolagen yang diekstraksi dengan metode enzimatis (*Pepsin Solubilized Collagen*, *PSC*), ternyata menghasilkan



Gambar 2. Rerata nilai rendemen kolagen (%) kulit ikan nila hitam pada perlakuan konsentrasi asam asetat dan waktu ekstraksi yang berbeda.

Figure 2. Avarage value of collagen yield (%) of black tylopia skin with treatment of acetic acid concentration and extraction time that different.

Tabel 1. Perbandingan rendemen kolagen dari berbagai macam sumber  
 Table 1. Collagen yield comparison of various sources

| Sumber Kolagen/<br>Sources of Collagen | Rendemen/Yield                                      | Peneliti/Source of Research |
|--|---|-----------------------------|
| Cod skin                               | 20.0% (dry rendemen PSC)                            | Sadowska et al. (2003)      |
| Cuttlefish skin                        | 2.0% (dry rendemen ASC)<br>35.0% (dry rendemen PSC) | Nagai et al. (2001)         |
| Baramundy skin                         | 9.0% (web rendemen ASC)<br>4.7% (web rendemen PSC)  | Jongjareonak et al. (2004)  |
| Sardine scale                          | 50.9% (dry rendemen PSC)                            | Nagai et al. (2004)         |
| Carper scale                           | 7.0% (dry rendemen ASC)                             | Kimura et al. (1991)        |
| Sardine scale                          | 5.0% (dry rendemen ASC)                             | Nomura et al. (1996)        |
| Black tylapia skin                     | 6.0% (dry rendemen ASC)                             | Hasil Riset                 |

Keterangan/Note:

ASC = Acid Solubilised Collagen

PSC = Pepsin Solubilised Collagen

rendemen dalam jumlah yang lebih besar (Kimura et al. 1991; Nomura et al. 1996; Nagai et al. 2001; Sadowska et al. 2003; Jongjareonak et al. 2004; dan Nagai et al. 2004) (lihat Tabel 1). Ekstraksi kolagen dengan metode PSC menghasilkan rendemen lebih banyak dibandingkan metode ASC karena enzim memiliki aktivitas tinggi dan karakteristik khusus dalam pemotongan atau penguraian secara sempurna asam amino pembentuk rantai peptide protein kolagen (Sahubawa, 2008).

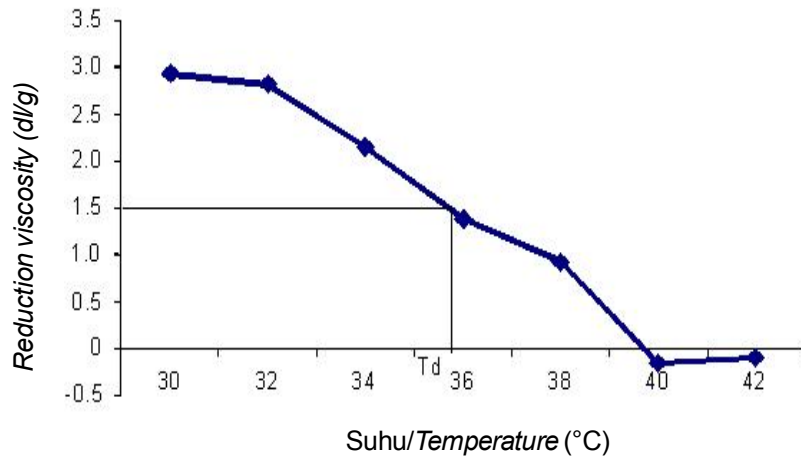
**Viskositas**

Berdasarkan hasil analisis (Tabel 2), terlihat bahwa makin tinggi suhu, maka waktu alir kolagen makin

menurun karena besarnya viskositas sampel. Menurunnya waktu alir tersebut disebabkan berkurangnya tahanan dari cairan sampel karena makin pendeknya rantai senyawa polimer kolagen akibat pengaruh suhu proses. dikatakan Basmal et al. (2007), viskositas adalah tahanan dari suatu cairan untuk mengalir. Besarnya viskositas bahan, menandakan makin besarnya tahanan cairan bahan tersebut. Menurut Glicksman (1969), viskositas adalah daya-aliran molekul dalam sistem larutan. Billmeyer (1962) menyatakan bahwa suatu senyawa polimer dengan rantai karbon yang lebih pendek ternyata memiliki viskositas lebih rendah dibandingkan dengan senyawa polimer rantai panjang pada jenis bahan yang sama. Dikatakan Basmal et al. (2005),

Tabel 2. Waktu alir dan viskositas kolagen sampel kulit ikan nila hitam pada suhu berbeda  
 Table 2. The stream time and viscosity of black tylapia skin collagen at the different temperatures

| Suhu/<br>Temperature (°C) | Waktu Alir (detik)/Stream Time (second)   |                                  | Viskositas<br>Spesifik/<br>Specipic<br>Viscosity (ηsp) | Viskositas<br>Tereduksi/<br>Reduction<br>Viscosity (ηsp/c) |
|---------------------------|---|----------------------------------|--|--|
|                           | Larutan Kolagen/<br>Collagen Solution (t) | Pelarut/solven (t <sub>0</sub> ) |  |  |
| 30                        | 203.9                                     | 192.6                            | 0.0587   | 2.9335   |
| 32                        | 196.9                                     | 186.4                            | 0.0563   | 2.8165   |
| 34                        | 186.8                                     | 179.1                            | 0.043  | 2.1496   |
| 36                        | 177.3                                     | 172.5                            | 0.0278   | 1.3913   |
| 38                        | 169.3                                     | 166.2                            | 0.0186   | 0.9326   |
| 40                        | 159.9                                     | 160.4                            | -0.0031  | -0.1557  |
| 42                        | 154.3                                     | 154.6                            | -0.0019  | -0.097   |



Gambar 3. Kurva denaturasi termal kolagen kulit ikan nila hitam.  
 Figure 3. Thermal denaturation curve of black tylapia skin.

terdapat 4 (empat) faktor (suhu, waktu, jenis enzim, serta jenis larutan/asam dan basa kuat) yang mempengaruhi proses pemotongan rantai/polimer protein. Makin besar dan banyak faktor tersebut, makin meningkat jumlah potongan rantai polimer.

Data Tabel 2 menunjukkan hasil perhitungan viskositas kolagen berdasarkan suhu yang berbeda. Makin tinggi suhu, makin menurun viskositas spesifik ( $c_{sp}$ ) maupun viskositas tereduksi ( $c_{sp}/c$ ). Viskositas spesifik dan tereduksi tertinggi didapatkan pada suhu 30°C yakni: 0,0587  $c_{sp}$  dan 2,9335  $c_{sp}/c$ , sedangkan nilai terendah didapatkan pada suhu 42°C yakni  $c_{sp}$  sebesar -0,0019 dan  $c_{sp}/c$  sebesar -0,0970. Penurunan viskositas disebabkan oleh penurunan berat molekul kolagen akibat pemutusan rantai polimer. Viskositas spesifik ( $c_{sp}$ ) dihitung dengan persamaan  $(t-t_0)/t_0$ , yang mengasumsikan bahwa densitas larutan dan pelarut (asam asetat) adalah sama ( $t = \text{efflux time}$  larutan kolagen dan  $t_0 = \text{efflux time}$  solven). Viskositas

tereduksi ( $c_{sp}/c$ ), dengan  $c$  adalah konsentrasi protein (g/dl), diplotkan melawan konsentrasi  $c$ .

### Suhu Denaturasi

Denaturasi dapat diartikan sebagai perubahan atau modifikasi struktur sekunder, tersier dan kuaterner molekul protein, tanpa diikuti dengan pelepasan ikatan kovalen. Suhu denaturasi kolagen dari sampel kulit ikan nila hitam sebesar 35,75°C, dengan bentuk kurva denaturasi termal kolagen seperti diperlihatkan pada Gambar 3. Suhu denaturasi kolagen kulit ikan nila hitam lebih tinggi dibandingkan dengan suhu denaturasi kolagen dari kulit ikan *Cod*, *Eel*, *Mackerel*, dan *Skipjack* (Muyonga et al. 2004) dan sirip hiu botol (*Bottle shark*) dan kakap putih (*Baramundy*) serta tulang kakap putih (Nagai et al. 2001). Suhu denaturasi kolagen kulit ikan berbeda-beda menurut spesies dan habitatnya, seperti diperlihatkan pada Tabel 3. Kolagen kulit ikan dari spesies yang hidup di

Tabel 3. Suhu denaturasi kolagen berbagai jenis bahan baku  
 Table 3. Collagen denaturation temperature from any raw materials

| Sumber Kolagen/<br>Source of Collagen | Suhu Denaturasi/<br>Denaturation Temperature | Peneliti/Researchers |
|---------------------------------------|--|----------------------|
| <i>Cod skin</i>                       | 15.0 °C                                      | Muyonga et al. 2004  |
| <i>Eel skin</i>                       | 29.3 °C                                      |                      |
| <i>Mackerel skin</i>                  | 26.1 °C                                      |                      |
| <i>Skipjack skin</i>                  | 29.7 °C                                      |                      |
| <i>Bottle shark fin</i>               | 25.0 °C                                      | Nagai et al. 2001    |
| <i>Scales of goldfish</i>             | 32.5 °C                                      |                      |
| <i>Baramundy bond</i>                 | 30.0 °C                                      |                      |
| <i>Baramundy fin</i>                  | 29.1 °C                                      |                      |
| <i>Testis sea urchin</i>              | 28.0 °C                                      |                      |

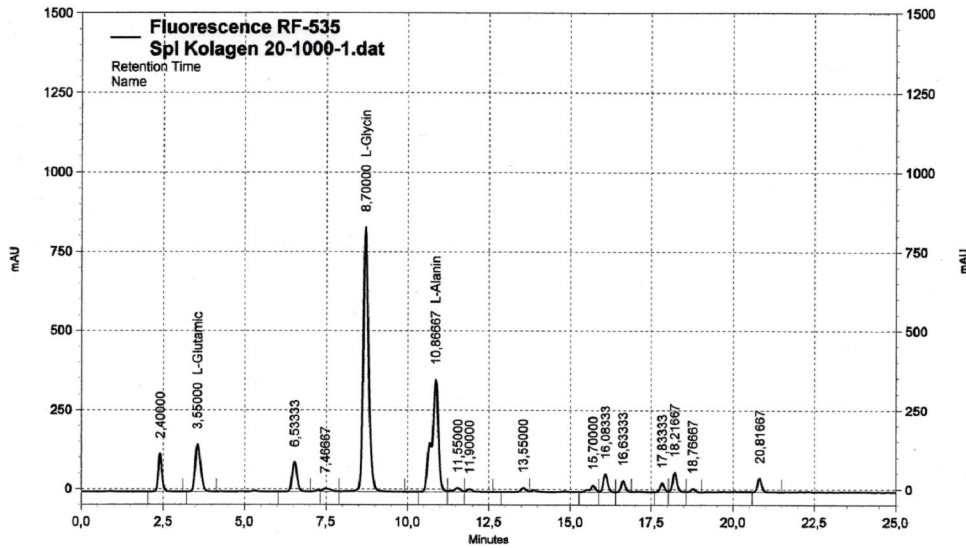
perairan dingin umumnya memiliki suhu denaturasi yang lebih rendah dibandingkan dengan ikan yang hidup di perairan tropis. Kestabilan kolagen terhadap suhu merupakan suatu adaptasi fisiologis ikan terhadap perubahan suhu lingkungannya (Ogawa *et al.* 2004).

Menurut Jongjareonrak *et al.* (2004), kestabilan kolagen kulit ikan dipengaruhi oleh komposisi 5 (lima) jenis asam amino utama (glisin, alanin, asam glutamate, serta prolin dan hidroksiprolin). Lebih lanjut

dikatakan bahwa makin tinggi kandungan prolin dan hidroksiprolin, makin stabil dan tinggi titik denaturasi struktur heliks kolagen yang dihasilkan. Kolagen yang didapatkan dari bahan baku berbeda, mempunyai titik denaturasi yang berbeda pula.

**Komposisi Asam Amino**

Hasil analisis komposisi asam amino kolagen dari sampel kulit ikan nila hitam seperti terlihat pada Gambar 4. Komposisi asam amino kolagen dari kulit



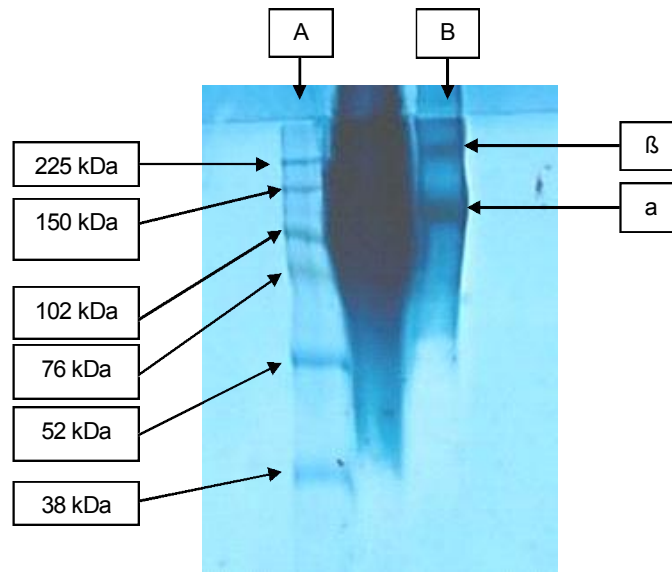
Gambar 4. Kurva hasil analisis asam amino kolagen kulit ikan nila hitam  
 Figure 4. Curve of collagen amino acid composition from black tylapia skin

Tabel 4. Perbandingan komposisi asam amino bermacam sumber kolagen  
 Table 4. Comparison of amino acid composition from various sourcecollagen

| No | Asam Amino/<br>Amino Acid | Sumber Kolagen/Source of Collagen<br>(per 1000 amino acid residu) |  |   |   |   |   |  |  |
|----|---------------------------|---|--|---|---|---|---|--|--|
|    |                           | Kulit Babi/Pig Skin   | Sisik Black Drum/Black Drum Scale (%) <sup>b</sup> | Kulit Kakap Putih/Baramundy Skin (%) <sup>c</sup> | Kulit Sotong/Cuttlefish Skin (%) <sup>d</sup> | Tulang sheepshead /Sheepshead bond (%) <sup>b</sup> | Sisik Sardin/Sardine Scale (%) <sup>e</sup> | Sisik Red Sea Bream/Red Sea Bream Scale (%) <sup>e</sup> | Kulit Nila Hitam/Black Tylapia Skin (%) <sup>f</sup> |
| 1  | Glisine                   | 33.8  | 34.5   | 25.2  | 31.8  | 34.20   | 34.0  | 34.0   | 52.9   |
| 2  | Alanine                   | 11.3  | 12.40  | 14.3  | 8.3   | 12.90   | 11.5  | 11.6   | 22.1   |
| 3  | Glutamate Acid            | 7.8   | 6.39   | 8.1   | 9.2   | 6.58  | 7.1   | 7.2  | 7.4  |
| 4  | Proline                   | 12.6  | 11.10  | 13.1  | 9.8   | 10.60   | 11.1  | 10.9   | td   |
| 5  | Hidroksiproline           | 7.9   | 8.79   | 8.1   | 9.0   | 8.85  | 8.6   | 8.7  | td   |

Keterangan/Note: <sup>a</sup> = Morimura *et al.* (2001)      <sup>d</sup> = Nagai *et al.* (2001)  
<sup>b</sup> = Ogawa *et al.* (2004)                                      <sup>e</sup> = Nagai *et al.* (2004)  
<sup>c</sup> = Jongjareonrak *et al.* (2004)                              <sup>f</sup> = Penelitian ini  
 td = tidak diamati





Gambar 5. Pola SDS polyacrylamide gel (8%) elektroforesis untuk marker bobot molekul rainbow (sumuran A) dan kolagen kulit nila hitam (sumuran B)  
 Figure 5. *Electroforencis gel SDS polyacrylamide models (8%) for rainbow molecule weight marker (well A) dan black tylapia skin (well B)*

ikan nila hitam didominasi oleh asam amino glisin, alanin dan asam glutamat. Hasil analisis menunjukkan bahwa kolagen sampel kulit nila mengandung glisin 5395,82 ppm; alanin 2979,15 ppm; dan asam glutamat 1684,42 ppm. Berdasarkan hasil penghitungan luas puncak, didapatkan kandungan glisin sebesar 52,9%, alanin 22,1% dan asam glutamat 7,4%. Kandungan asam amino glisin dan alanin dari sampel kulit nilai hitam sangat tinggi, sedangkan asam glutamat relatif sama dibandingkan dengan sampel kulit, sisik, dan tulang spesies ikan lainnya (Tabel 4).

Menurut Muyonga *et al.* (2004), kolagen memiliki kandungan asam amino metionin, tirosin dan histidin yang rendah dan tidak mengandung triptofan atau sistein. Ogawa *et al.* (2004), mengatakan bahwa komposisi asam amino protein kolagen didominasi oleh prolin, glisin, alanin, asam glutamat dan hidroksiprolin. Protein kolagen yang bermutu tinggi mengandung komposisi asam amino glisin, alanin, prolin, hidroksiprolin, dan asam glutamat dengan sifat amfoter tinggi, dimana jenis kolagen ini dapat membentuk struktur heliks yang paling stabil terhadap perubahan suhu dan pH (Morimura *et al.*, 2002). Dikatakan Junaidianto (2009), bahwa protein kolagen yang bermutu memiliki komposisi asam amino minimal 3 dari 5 jenis (prolin, alanin, glisin, asam glutamat, dan hidroksiprolin) karena memiliki keistimewaan dalam pemanfaatannya, yakni: mudah diserap dan mengalami degradasi dalam tubuh, tidak toksik dan biokompatibel, mudah dimodifikasi dan

diformulasikan dalam berbagai bentuk sediaan, mudah dimurnikan, serta tidak bersifat antigen.

### Tipe Kolagen

Pola SDS-PAGE sampel kolagen kulit ikan nila hitam dapat dilihat pada Gambar 5. Pola tersebut menyerupai Pola SDS-PAGE sampel kolagen kulit ikan *nile perch* (Muyonga *et al.* 2004); *blackdrum*, *sheepshead seabream* (Ogawa *et al.* 2004); dan ikan kakap merah (Jongjareonrak *et al.* 2004). Pola SDS-PAGE hasil pengamatan menunjukkan bahwa kolagen kulit ikan nila hitam memiliki rantai  $\alpha$  dan  $\beta$  yang tidak dapat teramati secara jelas karena masih tampak berhimpitan. Kondisi ini dapat disebabkan komposisi asam amino rantai  $\alpha_1$  dan  $\beta_2$  yang tidak jauh berbeda (bobot molekul relatif sama) (Wang *et al.* 2008). Kolagen sampel kulit ikan nila hitam juga memiliki rantai  $\beta$ , yang menunjukkan bahwa dalam kolagen ini terdapat komponen terikat-silang (*cross-linked components*), yaitu terjadinya *intra-molecular cross-linking* dan/atau *inter-molecular cross-linking* (Ogawa *et al.* 2004).

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### Kesimpulan

Berdasarkan hasil analisis statistik, perlakuan konsentrasi asam asetat dan waktu ekstraksi tidak berpengaruh nyata terhadap pembentukan rendemen

bubuk kolagen dari sampel ikan nila hitam. Perlakuan asam asetat 0,75 M dengan lama waktu ekstraksi 16 jam menghasilkan rendemen bubuk kolagen terbesar (5,96%) dibandingkan lama waktu ekstraksi 48 jam (2,24%).

Kolagen kulit ikan nila hitam memiliki karakteristik: viskositas larutan kolagen menurun sejalan dengan peningkatan suhu; suhu denaturasi 35,75°C; kandungan asam amino glisin 52,99%, alanin 22,08% dan asam glutamat 7,45%, serta termasuk kolagen tipe-I”.

### Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lanjutan menggunakan konsentrasi asam asetat 0,75% dengan waktu ekstraksi lebih kecil dari 16 jam.
2. Penting dilakukan riset lanjutan tentang karakteristik kolagen dari kulit dan sisik jenis ikan lainnya dengan metode ekstraksi enzimatik atau basa.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada mahasiswa: Tyas Junaidianto, Diah Probo Ningtyas, dan Mastori, atas perhatian dan bantuannya dalam menyiapkan bahan, peralatan, serta rekap data.

### DAFTAR PUSTAKA

- Basmal, J., P. Agung, dan Y. Farida. 2007. Pengaruh Suhu Esterifikasi terhadap Kualitas dan Kuantitas Kitosan Larut Air yang Dibuat dari Cangkang Rajungan. *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*. 2 (2): 99-106.
- Basmal, J., Agung, P., dan Fawzya, Y.N. 2005. Pengaruh Konsentrasi Asam Monokloroasetat terhadap Karboksimetil. *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia*. 11(8): 47-55.
- Billmeyer, F.W. 1962. *Textbook of Polymer Science*. Interscience Publisher, New York.
- Chvapil, M. 1979. Industrial Uses of Collagen. In: D.A.D. Parry and L.K. Creamer (Eds.) *Fibrous Protein: Scientific, Industrial, and Medical Aspects*. Academic Press, New York. pp. 247-267.
- Glicksman, M. 1969. *Gum Technology in Food Industry*. Academic Press. New York.
- Jongjareonrak, A., S. Benjakul, W. Visessanguan, T. Nagai, and M. Tanaka. 2004. Isolation and Characterisation of Acid and Pepsin-Solubilised Collagens from the Skin of Browns-tripe Red Snapper (*Lutjanus vitta*). *Food Chemistry*.
- Junaidianto, T. 2009. *Isolasi dan Karakterisasi Kolagen dari Kulit Ikan Kerapu Macan*. Skripsi. Program Studi Teknologi Hasil Perikanan, Jurusan Ilmu Perikanan, Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. pp. 18-21.
- Kimura, S., Miyauchi, Y., dan Uchida, N. 1991. Scale and Bone Type I Collagens of Carp (*Cyprinus carpio*). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 99B: 473-476.
- Morimura, S., Nagata, H., Uemura, Y., Fahmi, A., Shigematsu, T., and Kida, K. 2002. Development of an Effective Process for Utilization of Collagen from Livestock and Fish Waste. *Process Biochemistry*. 37: 403-142.
- Muyonga, J.H., Cole, C.G.B., and Duodu, K.G. 2004. Characterisation of Acid Soluble Collagen from Skins of Young and adult Nile Perch (*Lates niloticus*). *Food Chemistry*. 85: 81-89.
- Nagai, T., Yamashita, E., Taniguchi, K., Kanamori, N., and Suzuki, N. 2001. Isolation and Characterization of Collagen from The Outer Skin Waste Material of Cuttlefish (*Sepia lycidas*). *Food Chemistry*. 72: 425-429.
- Nagai, T., Izumi, M., and Ishii, M. 2004. Fish Scale Collagen Preparation and Partial Characterization. *International Journal of Food Science and Technology* 39: 239-244.
- Nomura, Y., Sakai, H., Ishii, Y., dan Shirai, K. 1996. Preparation and Some Properties of Type I Collagen from Fish Scales. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 60: 2092-2094.
- Ogawa, M., Portier, R. J., Moody, M.W., Bell, J., Schexnayder, M.A., and Losso, J.N. 2004. Biochemical Properties of Bone and Scale Collagens Isolated from The Subtropical Fish Black Drum (*Pogonia cromis*) and Sheepshead Seabream (*Archosargus probatocephalus*). *Food Chemistry*. 88: 495-501.
- Rehn, M., Veikkola, T., Kukkk-Valdre, E., Nakamura, H., Ilmonen, M., Pihlajaniemi, T., Alitalo, K., and Vuori, K.. 2001. Interaction of Endostatin with Integrins Implicated in Angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 98: 1024-1029.
- Sadowska, M., Kolodziejaska, I., and Niecikowska, C. 2003. Isolation of Collagen from the Skins of Baltic Cod (*Gadus morhua*). *Food Chemistry*. 81: 257-262.
- Sahubawa, L. 2008. Fungsi dan Peranan Enzim dalam Pengolahan Produk Perikanan dalam *Buku Kimia dan Biokimia Hasil Perikanan*, Edisi April 2008. Program Studi Teknologi Hasil Perikanan, Jurusan Ilmu Perikanan Fakultas Pertanian UGM.
- Sambrook, J. and Russel, D. W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. CHSL Press. New York.
- Sudarmadji, S. 1996. *Teknik Analisa Biokimiawi*. Penerbit Liberty, Yogyakarta.
- Wang, L., An, X., Yang, F., Xin, Z., Zhao, L., and Hu, Q. 2008. Isolation and Characterisation of Collagens from Skin, Scale and Bone of Deep-sea Redfish (*Sebastes mentella*). *Food Chemistry*. 108: 616-623.
- Yamaguchi, K. 2002. *Bovine Spongiform Encephalopathy and People*. Iwanami Press, Tokyo.