KARAKTERISASI KOLAGEN LARUT ASAM DARI KULIT IKAN TUNA (*THUNNUS albacores.*) DENGAN METODE HIDROEKSTRAKSI***THE CHARACTERIZATION OF COLLAGEN ACID SOLUBLE FROM YELLOW FIN TUNA (*THUNNUS albacores.*) FISH SKIN BY USING HYDROECTION METHOD*****Joice Patrecia M. Kolanus, Sugeng Hadinoto, Syarifuddin Idrus**

Balai Riset dan Standardisasi Industri Ambon

Jl.Kebun Cengkeh Ambon 97128

Email : joicekolanus@gmail.com

Diterima : 19-03-2019

Direvisi : 11-04-2019

Disetujui : 23-05-2019

ABSTRAK

Kolagen merupakan produk yang banyak diperlukan dalam berbagai industri, baik industri pangan maupun non pangan namun sampai saat ini masih impor dari negara lain. Untuk memenuhi kolagen dalam negeri maka sudah dilakukan penelitian tentang sumber-sumber kolagen halal terutama dari limbah perikanan. Penelitian ini bertujuan untuk mengekstrak kolagen dari limbah kulit ikan tuna (*Thunnus albacore.*) dengan variasi konsentrasi pelarut asam asetat dan metode hidroekstraksi. Pembuatan kolagen dari kulit ikan tuna dilakukan dengan metode asam alkali melalui perendaman dalam asam asetat konsentrasi 0,05 M dan 0,1 M selama 2 jam dan metode hidroekstraksi suhu 40°C selama 1 jam. Sifat-sifat kolagen yang diamati yaitu rendemen, gugus fungsi dan komposisi asam amino. Hasil penelitian menunjukkan bahwa metode hidroekstraksi dengan pengeskrak asam asetat 0,05 M dan 0,1 M memiliki rendemen berturut turut sebesar 1,95% dan 2,57%. Kolagen teridentifikasi dari gugus fungsi amida A, amida B, amida I, amida II dan amida III. Kadar asam amino dengan komposisi tertinggi yaitu asam glutamat, glisin, alanin, arginin dan prolin.

Kata kunci : kolagen,kulit ikan tuna,hidroekstraksi**ABSTRACT**

*Collagen is a product that is widely needed in various industries, both food and non-food industries, But until now it is still imported from other countries. To meet domestic collagen, research has been conducted on sources of halal collagen, especially from fisheries waste. This study aims to extract collagen from tuna skin waste (*Thunnus albacore.*) With variations in the concentration of acetic acid solvents and hydro-extraction methods. Making collagen from tuna skin is done by acid alkali method through immersion in acetic acid concentrations of 0.05 M and 0.1 M for 2 hours and the hydroelectric method of 40°C for 1 hour. The properties of collagen were observed namely yield, functional group and amino acid composition. The results showed that the hydro-extraction method with 0.05 M and 0.1 M acetic acid extraction had a yield of 1.95% and 2.57 & respectively. Collagen was identified from the functional groups amide A, amide B, amide I, amide II and amide III. Amino acid levels with the highest composition are glutamic acid, glycine, alanine, arginine and proline.*

Keywords : collagen, tuna skin, hydro-extraction

PENDAHULUAN

Kolagen merupakan produk yang banyak diperlukan dalam berbagai industri, baik, industri makanan, industri farmasi, industri kosmetik juga digunakan untuk kepentingan biomedis dan farmasetika. (Nurilmala dkk, 2017: 1). Produksi kolagen dalam negeri sendiri sampai saat ini masih belum optimal. Pada Tahun 2003, Indonesia masih mengimpor lebih dari 6200 ton kolagen dengan harga per gram mencapai kurang lebih US\$ 1. Kebutuhan kolagen di Indonesia terpenuhi dengan cara mengimpor dari berbagai negara seperti Perancis, Jerman, Jepang dan India (Tridhar N.A, 2016: 3). Data International Trade Center (2016) menyebutkan bahwa impor gelatin termasuk kolagen ke Indonesia dengan HS Code 3503 pada Tahun 2015 adalah 4.109 ton dengan nilai mencapai US\$ 31.741.000. (Fawzya, Y.N, dkk., 2016: 2). Untuk itu diperlukan pengembangan industri dalam negeri untuk memproduksi kolagen dan mengatasi masalah impor.

Kolagen merupakan komponen struktural utama jaringan ikat putih (*white connective tissue*) yakni sekitar 25 – 30% (Walter dan Stegemann (2014) dalam Kartika I.W dkk (2016: 223). Protein kasar kulit dapat menggambarkan kemungkinan maksimum komponen kolagen yang dapat diekstraksi. Kittiphattanabawon et al. (2010: 793) menyatakan bahwa sumber kolagen alternatif dapat berasal dari kulit dan bagian tulang ikan yang merupakan limbah dari hasil pengolahan. Kulit ikan memiliki protein struktural yang kompleks untuk mempertahankan kekuatan fleksibilitas kulit, ligamen, tulang, sendi, otot, tendon, gusi, mata, pembuluh darah, kuku, dan rambut. Kandungan protein ikan adalah lebih dari 90% dan memiliki 18 jenis asam amino yang 7 di antaranya penting untuk konsumsi manusia. Produk kolagen bahan ini mudah diserap dan memiliki nilai biologis tinggi yang mendorong penyerapan vitamin dan mineral (Kumar M.H et al., 2011: 97).

Menurut Nagai dan Suzuki, (2000) dan Sato, et al., (1989) dalam Nurhayati dkk., (2013: 86) menyatakan bahwa tipe kolagen yang teridentifikasi pada ikan hanya tipe I dan V. Kolagen tipe I terdapat pada kulit, tulang dan sisik ikan, sedangkan kolagen tipe V terdapat pada jaringan ikat dalam kulit, tendon, dan otot ikan yang juga mengandung kolagen tipe I.

Menurut Wang, W et al. (2013: 1), penelitian tentang hidrolisis kolagen yang berasal dari ikan banyak digunakan di berbagai bidang termasuk makanan fungsional, minuman, dan suplemen makanan yang menunjukkan bahwa sifat fungsional tersebut dibutuhkan dalam makanan. Penelitian-penelitian tersebut diantaranya adalah hidrolisis kolagen yang berasal dari ikan untuk meningkatkan metabolisme tulang (Guillermine et al. 2010); untuk mencegah penuaan kulit (Tanaka et al. 2009); optimalisasi proses produksi kolagen hidrolisat kulit dengan sifat antioksidan (Yang et al. (2009); protein hidrolisat dari kulit nila dihidrolisis dengan enzim protease (Wasswaet al. (2008).

Limbah ikan terdiri dari tulang, kulit, sirip, kepala, sisik dan jeroan. Limbah ikan ini merupakan salah satu permasalahan terbesar dalam industri pengolahan ikan karena dapat menyebabkan masalah lingkungan disebabkan karena limbah ini biasanya belum diolah secara baik. Diketahui bahwa limbah industri pembekuan dan pengalengan ikan tuna berpotensi sebagai sumber kolagen yang halal, salah satunya adalah bagian kulit. Mayasari (2016: 1) menyatakan bahwa kulit ikan tuna (*Thunnus albacares*) termasuk kulit berprotein tinggi sehingga berpotensi untuk dijadikan sumber kolagen. Menurut Chen et al (2016) dalam Nurilmala et al (2017: 340), kulit dan sisik memiliki kandungan kolagen yang lebih tinggi dibandingkan pada bagian tulang. Menurut Kolodziejska et al. (2008) dalam Devi (2017: 258) menyatakan bahwa kulit ikan merupakan bahan baku yang baik untuk mengisolasi kolagen karena kolagen merupakan penyusun 80% protein yang terdapat pada kulit ikan.

Menurut Wulandari (2016: 1) menyatakan bahwa isolasi kolagen dari limbah produk perairan telah banyak dilakukan, baik di Indonesia maupun di luar negeri. Di Indonesia, isolasi kolagen telah dilakukan pada kulit ikan pari (Nur'aenah, 2013); kulit ikan buntal pisang (Faisal,

2014), kulit ikan ekor kuning (Astiana., dkk., 2016); kulit ikan tuna (*Thunnus sp.*) (Mayasari, 2016), kulit dan tulang ikan cakalang (Stephani dkk, 2016); gelembung renang ikan cunang (Djailani, 2016); sedangkan kolagen yang diisolasi dari luar negeri di antaranya dari kulit ikan karper rumput (Liu et al., 2015a), kulit, sisik dan gelembung renang ikan karper rumput (Liu et al. 2015b), sisik ikan mata merah (Chen et al., 2016) ; sisik ikan nila (Huang et al. 2016); sedangkan menurut Devi, dkk (2017: 256) menyatakan bahwa kolagen yang diekstrak dari ikan air laut antara lain dari tulang rawan ikan hiu *Chiloscyllium punctatum* dan Blacktip (Kittiphattanabawon et al. 2010), abalone (Dong et al. 2012), dan kulit ikan tuna (Hema et al. 2013).

Kulit ikan tuna dilaporkan mengandung kolagen dengan nilai rendemen yang bervariasi antara 11 - 63% tergantung dari jenis ikan, bahan pengekstrak dan teknik ekstraksi kolagen (Nagai & Suzuki, 2000 dalam Nurhayati, dkk (2013: 86).

Proses hidrolisis atau isolasi kolagen menggunakan beberapa teknik. Teknik isolasi kulit ikan umumnya diekstraksi dengan metode asam (ASC), alkali dan enzim (PSC). Teknik ini mampu menghasilkan kolagen dengan tingkat kemurnian yang tinggi namun memerlukan waktu lama, jumlah bahan kimia yang banyak dan biaya produksi yang tinggi sehingga menyebabkan kolagen yang dihasilkan tidak mampu berdaya saing dengan kolagen komersial.

Teknik lain yang dianggap memerlukan biaya produksi yang rendah dan mampu menghasilkan kolagen dengan waktu yang relatif cepat yaitu menggunakan metode hidrotermal atau hidroekstraksi. Teknik hidroekstraksi merupakan proses isolasi menggunakan air sebagai katalis dan temperatur sebagai tekanan. Jadi proses hidroekstraksi atau proses hidrotermal ini adalah proses ekstraksi yang melibatkan air dan tekanan suhu (*high temperature short time/HTST*) dengan akuades sebagai media pindah panas.

Wulandari (2016: 30) mengisolasi kolagen dari kulit ikan gabus menggunakan metode hidroekstraksi menghasilkan rendemen sebesar 16% (bb), komposisi asam amino yang dominan yaitu glisina 27,11%, prolina 13,87% dan alanina 12,58% dan merupakan kolagen tipe I dicirikan dengan adanya rantai $\alpha 1$ dan $\alpha 2$. Djailani dkk. (2016: 156) menyatakan mengekstraksi kolagen dari gelembung renang ikan cunang menggunakan kombinasi metode ASC dan hidroekstraksi menghasilkan kolagen tipe I dengan rendemen sebesar 63,35%.

Pemanfaatan limbah kulit ikan tuna sebagai kolagen sangat penting untuk dikembangkan karena limbah kulit ikan ini selain menjadi sumber kolagen juga mendorong pemanfaatan bahan alam sehingga dapat menerapkan efektivitas bahan, mengurangi pencemaran lingkungan, menerapkan pengolahan bersih (*cleaner production*) serta meningkatkan nilai jual kulit ikan dari sekedar limbah menjadi bahan yang bernilai lebih. Kelebihan lain pembuatan kolagen dengan bahan baku kulit dibandingkan dengan bahan baku dari tulang dan sisik yaitu membutuhkan waktu proses lebih cepat dengan proses perendaman asam. Disamping itu kulit ikan memiliki tekstur yang lebih lunak dibandingkan dengan tulang sehingga membutuhkan waktu proses ekstraksi yang lebih cepat. Oleh karena itu penting dilakukan penelitian pengembangan produk kolagen dari kulit ikan tuna.

Pemahaman tentang sifat-sifat kolagen dan mikroskopis kulit ikan tuna menjadi hal yang penting karena dapat dijadikan sebagai alternatif kolagen komersial yang halal. Kolagen dapat diekstrak dan diisolasi dengan beberapa metode atau proses, namun hingga kini metode ekstraksi asam masih mendominasi karena cukup mudah dilakukan. Proses isolasi kolagen dengan beberapa proses ekstraksi sangat mempengaruhi rendemen dan karakteristik kolagen yang dihasilkan, sehingga penelitian tentang proses isolasi dan karakterisasi kolagen melalui beberapa modifikasi proses ekstraksi perlu dilakukan untuk memperoleh kualitas dan kuantitas kolagen yang maksimal. Pada penelitian ini produksi kolagen dari kulit ikan tuna (*Thunnus albacore*) menggunakan metode hidroekstraksi agar supaya dapat menghemat biaya produksi sehingga dapat diterapkan di masyarakat. Namun perlu untuk mengetahui komposisi

penyusun kolagen dengan menggunakan metode hidroekstraksi ini. Oleh karena itu penelitian karakterisasi kolagen larut asam dari kulit ikan tuna (*Thunnus albacore*) dengan metode hidroekstraksi bertujuan untuk melakukan ekstraksi kolagen kulit ikan tuna (*Thunnus albacore*) dengan variasi konsentrasi pelarut asam asetat dan metode hidroekstraksi. Penelitian yang digunakan adalah penelitian deskriptif kuantitatif dengan pendekatan eksperimen laboratorium.

Manfaat dari penelitian ini diharapkan dapat meningkatkan nilai ekonomis limbah industri pembekuan dan pengalengan ikan tuna, dalam hal ini bagian kulit ikan tuna serta memperoleh sumber bahan baku kolagen dari limbah perikanan. Sedangkan dampaknya yaitu dapat mengurangi ketergantungan akan produk impor kolagen.

METODE PENELITIAN

Bahan dan Alat

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah limbah kulit ikan tuna (*Thunnus albacares*) yang diperoleh dari limbah industri pembekuan ikan PT. AKFI yang berada di desa Laha, Teluk Ambon. Kulit ikan dibawa dengan cool box yang sudah diberi es. Dicuci bersih dan dipotong-potong dengan ukuran kira-kira $0,5 \times 0,5 \text{ cm}^2$ dan disimpan pada suhu beku sampai kulit digunakan untuk tahap ekstraksi. Bahan lain yang digunakan antara lain : Aquades, NaOH, CH_3COOH , BSA. Sedangkan peralatan yang digunakan antara lain : neraca analitik, pH meter, gunting bedah, gelas ukur, pipet, *waterbath incubator shaker*, *magnetic stirrer* ukuran 5 cm, *rotary evaporator*, instrumen HPLC, FTIR dan *freeze dryer*.

Metode

Prosedur Kerja :

Preparasi sampel. Sampel yang digunakan merupakan limbah kulit ikan tuna yang diambil dari perusahaan pembekuan ikan PT. AKFI. Sampel kulit dibersihkan dari sisik dan daging yang masih menempel kemudian dicuci dengan air bersih. Selanjutnya dipotong menjadi ukuran kecil sekitar 2-3 cm. Setelah itu, dicuci kembali dan ditiriskan untuk menghilangkan air sisa pencucian.

Proses ekstraksi kolagen menggunakan metode hidroekstraksi mengacu pada modifikasi Liu et al. 2015 dalam Wulandari (2016: 17). Proses ekstraksi kolagen terdiri 3 tahap yaitu *pretreatment* dengan larutan NaOH, hidrolisis dalam larutan asam asetat, dan ekstraksi.

Tahap pertama yaitu proses *pretreatment* dengan larutan NaOH bertujuan untuk mengeliminasi non kolagen dan pengotor lainnya seperti lemak, mineral, pigmen dan *odor* (*degreasing*). Kulit ikan tuna (*Thunus albacore*.) direndam dalam larutan NaOH dengan konsentrasi 0,2 M selama 12 jam perendaman dan setiap 2 jam sekali larutan NaOH diganti. Rasio antara kulit dan larutan NaOH adalah 1:10 (b/v). Selanjutnya dinetralkan dengan aquades sebelum digunakan untuk tahap selanjutnya.

Tahap kedua adalah hidrolisis dengan larutan asam asetat (CH_3COOH) bertujuan untuk mengubah struktur serat kolagen sehingga mempermudah proses ekstraksi. Perlakuan konsentrasi asam asetat yang digunakan yaitu 0,05 M dan 0,1 M dan direndam selama 2 jam. Rasio antara kulit dan asam asetat adalah 1:10 (b/v). Hasil perendaman asam asetat kemudian dinetralkan dengan aquades hingga mencapai pH netral sebelum digunakan untuk ekstraksi.

Tahap ketiga yaitu ekstraksi. Hidroekstraksi dengan aquadest rasio 1 : 2 (b/v) pada suhu 40°C selama 1 jam menggunakan *waterbath shaker* kecepatan 150 rpm. Hasil ekstraksi ini disaring dengan dua lapis kain katun tipis untuk mendapatkan filtrat. Selanjutnya filtrat disentrifus untuk memisahkan lemak dengan protein hidrosiprolin. Filtrat hasil sentrifus

dikeringkan menggunakan *freeze drying* sehingga berbentuk bubuk. Bubuk kolagen ini siap untuk dilakukan analisa terhadap gugus fungsi dan asam amino.

Metode Analisis

Rendemen

Perhitungan rendemen kolagen basis kering yaitu dihitung berdasarkan persentase perbandingan berat kering kolagen dengan berat basah bahan baku kulit mentah sebelum ekstraksi. Rendemen menunjukkan keefektifan proses ekstraksi (Alhana dkk. 2015:155).

Analisis Gugus Fungsi dengan FTIR (Modifikasi Yan et al.2008 dalam Djailani, 2016)

Karakterisasi gugus fungsi kolagen untuk mengetahui gugus-gugus fungsi khas dari kolagen yang dihasilkan. Analisis menggunakan FT-IR (*Fourier Transform Infra-Red*). Gugus-gugus fungsi yang diperlihatkan pada spektrum kolagen digunakan untuk menentukan pola ikatan silang (*cross-linking*) yang terjadi sehingga perubahan pada stuktur sekunder kolagen dapat dipelajari. Sampel uji terlebih dahulu dibentuk pellet dengan campuran KBr. Sebanyak 100 mg KBr dan 2 mg sampel uji dicampurkan, kemudian ditumbuk sampai halus dan tercampur rata dalam mortaragate. Pengukuran sampel uji dilakukan pada gelombang antara 4000-5000 cm^{-1} . Spektra FTIR yang dihasilkan menunjukkan puncak-puncak serapan bilangan gelombang dari sampel uji. Gugus-gugus fungsi sampel uji ditentukan berdasarkan puncak serapan bilangan gelombang yang terdeteksi dengan wilayah serapan untuk gugus fungsi protein.

Analisis Asam Amino (AOAC, 2012)

Untuk mengetahui Komposisi asam amino dari kolagen kulit ikan tuna digunakan instrumen HPLC (*High Peformance Liquid Chromatography*). Perangkat HPLC dibilas dahulu dengan eluen yang akan digunakan selama 2-3 jam. *Syringe* yang akan digunakan juga harus dibilas dengan aquades. Analisis asam amino menggunakan HPLC terdiri atas 4 tahap, yaitu (1) pembuatan hidrolisat protein; (2) pengeringan; (3) derivatisasi; dan (4) injeksi serta analisis asam amino. Khusus untuk pengujian asam amino bebas, tidak dilakukan proses hidrolisis dengan asam dan pemanasan.

a. Tahap Pembuatan hidrolisat protein

Sampel ditimbang sebanyak 0,2 g dan dihancurkan. Sampel yang telah hancur ditambahkan dengan HCl 6 N sebanyak 5 -510 ml, kemudian dipanaskan dalam oven pada suhu 100°C selama 24 jam. Proses pemanasan dilakukan untuk menghilangkan gas atau udara yang ada pada sampel agar tidak mengganggu kromatogram yang dihasilkan dan untuk mempercepat reaksi hidrolisis. Hidrolisat protein yang diperoleh disaring dengan milipore berukuran 0,45 mikron.

b. Tahap pengeringan

Hidrolisat protein ditambah dengan 30 μL larutan pengering. Larutan pengering dibuat dari campuran antara metanol, natrium asetat, dan trietilamin dengan perbandingan 2 : 2 : 1. Proses pengeringan dibantu menggunakan gas nitrogen untuk mempercepat pengeringan dan mencegah oksidasi.

c. Tahap derivatisasi

Sebanyak 30 μL larutan derivatisasi ditambahkan pada hasil pengeringan. Larutan derivatisasi dibuat dari campuran antara larutan metanol, pikoiotisianat, dan trietilamin dengan perbandingan 3 : 3 : 4. Proses derivatisasi dilakukan agar detektor mudah untuk mendeteksi

senyawa yang ada pada sampel, kemudian dilakukan pengenceran dengan cara menambahkan 10 mL asetonitil 60% atau buffer fosfat 0.1 M lalu dibiarkan selama 20 menit. Hasil pengenceran disaring kembali menggunakan milipor berukuran 0.45 mikron.

d. Injeksi ke HPLC

Hasil saringan diambil sebanyak 20 µL untuk diinjeksikan ke dalam HPLC. Penghitungan konsentrasi asam amino dilakukan dengan cara membandingkan kromatogram sampel dengan standar. Pembuatan kromatogram standar menggunakan asam amino yang mengalami perlakuan yang sama dengan sampel.

Kandungan masing-masing asam amino pada bahan dapat dihitung dengan rumus :

$$\text{Konsentrasi Asam Amino} = \frac{\text{Luas area contoh} \times C \times \text{FP} \times \text{BM} \times 100}{\text{Luas area standar} \times \text{berat contoh (g)}} \dots\dots\dots (1)$$

Keterangan:

C = Konsentrasi standar asam amino

FP = Faktor pengenceran

BM = Bobot molekul dari masing-masing asam amino

HASIL DAN PEMBAHASAN

Rendemen

Rendemen yang diperoleh dari pengolahan kolagen merupakan salah satu parameter penting dalam menilai tingkat efektivitas produksi kolagen yang melalui beberapa tahap seperti pemotongan kulit ikan, demineralisasi, hidrolisis dan ekstraksi hingga proses pengeringan. Semakin tinggi nilai rendemen suatu perlakuan, maka semakin tinggi tingkat efektivitas perlakuan tersebut (Maulida, 2011 dalam Samosir A.S dkk. (2018: 107). Rendemen kolagen yang diperoleh pada ekstraksi asam kombinasi metode hidroekstraksi dengan konsentrasi perendaman asam asetat 0.05 M dan 0,1M berturut-turut adalah 1,95% dan 2,57%. Rendemen yang diperoleh tergolong kecil diakibatkan banyaknya kolagen yang terbuang pada saat proses pencucian mengakibatkan hilangnya massa kolagen dan kemungkinan juga diakibatkan dari proses hidrolisis dan ekstraksi yang kurang sempurna. Menurut Naro, A.B dkk. (2013: 172) menyatakan bahwa rendemen, karakter, dan komposisi molekul kolagen sangat dipengaruhi oleh perbedaan spesies, habitat dan perlakuan pada proses ekstraksi.

Gugus fungsi Senyawa Kimia Pembentuk Kolagen

Analisis FTIR dilakukan untuk memastikan senyawa yang dihasilkan merupakan kolagen berdasarkan gugus-gugus fungsi penyusunnya. Hasil analisis menunjukkan adanya puncak serapan amida A, amida B, amida I, amida II dan amida III (Gambar 1). Data sebaran amida kolagen kulit ikan tuna konsentrasi 0,05 M dan 0,1 M metode hidroekstraksi menunjukkan puncak serapan amida A, amida B, amida I, amida II dan III mengidentifikasi struktur pada protein kolagen. Data sebaran amida kolagen kulit ikan tuna konsentrasi asam asetat 0,05 M dan 0,1 M metode hidroekstraksi ditampilkan pada Gambar. 1

Gambar 1. Data Sebaran Amida Kolagen Kulit Ikan Tuna Konsentrasi 0,05 M Dan 0,1 M

Gambar 2. Spektrum FT-IR Kolagen Kulit Ikan Tuna Konsentrasi 0,05 M

Gambar 3. Spektrum FT-IR Kolagen Kulit Ikan Tuna Konsentrasi 0,1 M

Kolagen kulit ikan tuna konsentrasi 0,05 M dan 0,1 M metode hidroekstraksi memunculkan puncak serapan Amida A berturut-turut yakni 3412,01 dan 3399,18 cm^{-1} , amida B yaitu 2925,34 dan 2928,88 cm^{-1} , Amida I yaitu 1654,28 dan 1646,18 cm^{-1} , Amida II yaitu 1558,96 dan 1543,20 cm^{-1} , Amida III yaitu 1245,03 dan 1244,33 cm^{-1} .

Karakteristik gugus fungsi kolagen kulit ikan tuna dengan konsentrasi 0,05 M dan 0,1 M ditampilkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Karakteristik Gugus Fungsi Kolagen Kulit Ikan Tuna Dengan Konsentrasi Pengekstrak Asam Asetat 0,05 M dan 0,1 M

Amida	Wilayah puncak serapan (cm ⁻¹)	Bilangan gelombang puncak serapan (cm ⁻¹)		Keterangan	Referensi
		Puncak serapan kolagen kulit ikan tuna dengan pengestrak asam asetat			
		0,05 M	0,1 M		
Amida A	3315-3440	3412,01	3399,18	Gugus NH <i>stretching</i>	J.Krishnamoorthi et al.(2017)
Amida B	2925-2935	2925,34	2928,88	Gugus CH ₂ <i>asymetrical stretch</i>	Muyonga et al.(2004)*
Amida I	1600-1660	1654,28	1646,18	Gugus Karbonil (ikatan C=O) <i>stretching</i>	J.Krishnamoorthi et al.(2017)
Amida II	1550-1600	1558,96	1543,20	CN <i>stretching</i> NH <i>bending</i>	Ahmad dan Benjakul (2010), Duan et al. (2009)*
Amida III	1220-1320	1245,03	1244,33	Struktur unting ganda tiga kolagen	Benjakul et al. (2010), Heuet al.(2010)*

Keterangan : Sumber : *Djailani (2016)

Berdasarkan Tabel 1 dan Gambar 2 dan 3, menunjukkan bahwa spektrum FT-IR kolagen kulit ikan tuna metode hidroekstraksi pada suhu ekstraksi 40°C dimulai pada 3412 cm^{-1} dan mengalami penurunan ke frekuensi yang lebih rendah menjadi 661 cm^{-1} . Daerah serapan amida A, B, I, II, dan III untuk pengekrak 0,05 M berada pada 3412, 2925, 1654, 1558, dan 1245 cm^{-1} . Sedangkan untuk pengesktrak 0,1 M berada pada 3399, 2928, 1646, 1543 dan 1244 cm^{-1} . Amida A kolagen 0,05 M pada 3412 cm^{-1} sedangkan 0,1 M pada 3399 cm^{-1} . Hal ini menunjukkan bahwa 0,1 M lebih banyak kelompok NH yang terlibat dalam ikatan hidrogen dibandingkan pada 0,05 M. Daerah serapan amida A pada kolagen terjadi karena regangan NH dari gugus amida dengan ikatan hidrogen dan asam amino hidroksiprolina.

Daerah serapan amida I,II dan III diketahui berhubungan langsung dengan bentuk polipeptida. Ikatan N-H terjadi pada kisaran 3400-3440 cm^{-1} . Ikatan N-H (Amida A) pada kolagen yang diekstraksi pada suhu 40°C mengalami penurunan ke frekuensi yang lebih rendah. Amida A dari kolagen metode hidroekstraksi pengekrak asam asetat 0,05M dan 0,1M kulit ikan tuna mengalami penurunan amplitudo pada 3300 cm^{-1} . Puncak serapan amida B yang diimiliki

kolagen kulit ikan tuna terdeteksi pada bilangan gelombang kisaran 2925,34 dan 2928,88 cm^{-1} yang mengindikasikan adanya gugus khas kolagen yaitu amida B. Coates (2000) dalam Mayasari (2016: 14), bilangan gelombang yang mengindikasikan serapan amida B terbentuk dari gugus CH_2 *asymmetrical stretch*. Puncak serapan Amida I kolagen kulit ikan tuna pada suhu ekstraksi 40°C menunjukkan nilai 1654,28 cm^{-1} dan 1646,18 cm^{-1} . Singh et al. (2011) dalam Devi dkk (2017: 261) menyatakan bahwa nilai amida I yang rendah dikarenakan besarnya porsi non-heliks pada telopeptida sehingga ikatan intramolekuler hidrogen antara C=O pada peptida dan keterkaitan donor hidrogen lebih rendah. Amida I dihubungkan dengan adanya peregangan gugus karbonil ikatan C=O sepanjang polipeptida dengan kontribusi ikatan NH dan renggangan CN dan menjadi faktor penting dalam perannya untuk mengetahui struktur sekunder dari protein. Amida I terdiri dari empat komponen struktur sekunder protein yaitu α -helix, β -sheet, β -turn dan random coil yang saling bertumpang tindih. Amida II berhubungan langsung dengan CN *stretching* dan NH *bending*. yang berada dalam wilayah serapan 1550 - 1600 cm^{-1} . Puncak serapan amida II pada kolagen kulit ikan tuna 0,05 M dan 0,1 M pada suhu 40°C berada pada wilayah serapan berturut-turut 1558,96 cm^{-1} dan 1543,20 cm^{-1} .

Muyonga et al. (2004) dalam Gadi dkk (2017: 675) menyatakan bahwa amida I memiliki empat komponen struktur sekunder protein, yaitu α -heliks, β -sheet, β -turn, dan random coil yang saling bertumpang tindih. Hal ini menunjukkan bahwa kolagen dari kulit ikan tuna memiliki struktur β -sheet belum terdenaturasi menjadi α -helix ciri khas gelatin.

Stabilitas triple helix dalam kolagen tergantung pada ikatan hidrogen (Krishnamoorthia J., et al. (2017: 39)

Analisis Asam Amino

Suryaningrum et al.(2010) dalam Astiana dkk (2016: 87) menyatakan bahwa kualitas suatu protein dapat dinilai dari kandungan asam amino yang menyusun protein tersebut. Asam amino berkontribusi terhadap kestabilan struktur helix kolagen. Komposisi asam amino kolagen kulit ikan tuna yang diekstrak menggunakan asam asetat konsentrasi 0,05 M dan 0,1 M dengan metode hidroekstraksi disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Komposisi Asam Amino Kolagen Kulit Ikan Tuna Yang Diekstrak Menggunakan Asam Asetat Konsentrasi 0,05 M Dan 0,1 M

Asam Amino	0,05 M (%)	0,1 M (%)
Asam Aspartat	3.124	2.148
Asam Glutamat	7.174	7.128
Serin	3.223	3.217
Glisin	12.251	13.064
Histidin	1.365	1.188
Arginin	5.821	6.027
Treonin	1.649	1.776
Alanin	4.955	5.216
Prolin	4.857	4.621
Tirosin	1.781	1.752
Valin	2.317	2.451
Methionin	0.824	0.9
Sistein	0.944	0.883
Isoleusin	1.258	1.115
Leusin	2.118	2.455
Phenilalanin	1.017	0.754
Lisin	3.021	2.619

Hasil analisis komposisi asam amino menunjukkan bahwa asam glutamat, glisin, arginin, alanin dan prolin merupakan lima asam amino yang paling banyak terdapat pada kolagen kulit ikan tuna metode hidroekstraksi pelarut asam asetat 0,05 M dan 0,1 M. Hal ini sesuai dengan pernyataan Hema et al. (2013) dalam Djailani dkk (2016: 162) menyatakan bahwa komposisi asam amino dari kolagen cenderung didominasi oleh glisin, prolin, hidroksiprolin dan alanin. Komponen asam amino yang paling banyak terkandung yaitu 1/3 Glisin, 6-10% hidroksiprolin, 10-12% Prolin. Diketahui bahwa komponen prolin memberikan stabilitas termal pada kolagen. Kittiphattanabawon et al. (2005: 367) menyatakan bahwa glisin merupakan asam amino utama pembentuk kolagen yang meliputi 30% dari total asam amino. Kolagen hidroekstraksi dari kulit ikan tuna memiliki kandungan asam glutamat, glisin, arginin, alanin dan prolin berturut-turut sebesar 7,17%; 12,25%; 5,82%; 4,95%; dan 4,86% dari total asam amino kolagen. Hasil ini menunjukkan bahwa glisin merupakan asam amino yang paling dominan pada kolagen. Asam amino glisin pada kolagen yaitu membentuk tiga rantai alfa heliks menjadi struktur super heliks. Alanin merupakan asam amino non polar dengan gugus R alifatik sama seperti pada asam amino glisin. Fungsi alanin juga sama seperti glisin yakni membentuk tiga rantai alfa heliks. Djailani (2016: 163,164), menyatakan bahwa prolin merupakan asam amino yang unik dan sering disebut imino *acid*. Kandungan asam imino akan meningkatkan stabilitas termal dari kolagen dalam stuktur alfa heliks, energi yang dibutuhkan untuk mempertahankan struktur primer lebih rendah sehingga protein akan lebih stabil. Imino *acid* ini memiliki cincin pirolidina yang berfungsi menahan struktur superheliks pada kolagen. Proses hidroekstraksi memiliki komposisi asam imino yang cukup tinggi. Kandungan asam amino arginin terdeteksi menjadi ciri khas tersendiri pada kolagen metode hidroekstraksi kulit ikan tuna. Arginin merupakan asam amino semi esensial yang memiliki banyak fungsi seperti terlibat dalam produksi berbagai enzim, hormon dan protein struktural yang mendukung pelepasan hormon pertumbuhan, insulin, glukagin dan prolaktin yang merupakan komponen dari hormon vesopressin yang diproduksi oleh kelenjar hipofisis serta merupakan prekursor fisiologis senyawa nitrat, poliamina, prolin, glutamat, kreatin, agmatin dan urea. Arginin sebagai penguat imunitas, merangsang timus dan mendorong produksi limfosit sehingga dapat diaplikasikan pada penyembuhan luka bakar dan luka lainnya. Hal ini menunjukkan manfaat dari asam amino arginin sebagai agen farmasi yang dapat diaplikasikan sebagai anti-aging. (Sari dkk. (2017: 614)

KESIMPULAN

Ekstraksi kolagen menggunakan metode hidroekstraksi dengan variasi pengeskrak asam asetat 0,05 M dan 0,1 M memiliki rendemen berturut turut sebesar 1,95% dan 2,57% dan teridentifikasi kolagen dari gugus fungsi amida A, amida B, amida I, amida II dan amida III. Hasil analisis asam amino kolagen kulit ikan tuna dengan metode hidroekstraksi menunjukkan bahwa asam glutamat, glisin, alanin dan prolin merupakan empat asam amino yang memiliki komposisi tertinggi.

SARAN

Kolagen dengan pengesttrak asam asetat 0,1 M dinilai lebih baik dari segi rendemen dan mutu asam amino, meskipun masih perlu ditingkatkan saat proses hidroekstraksi yaitu mengenai perlakuan lamanya waktu hidroekstraksi saat menggunakan *waterbath shaker* agar supaya ekstrak kolagen yang dihasilkan bisa terekstrak lebih sempurna. Rasio aquades dan sampel saat *running* hidroekstraksi sebaiknya 1:1 agar efisiensi waktu karena penetrasi panas lebih cepat dan waktu di *freeze dryer* juga lebih cepat.

DAFTAR PUSTAKA

- Alhana., P. Suptijah, dan K. Tarman. 2015. Ekstraksi dan Karakterisasi Kolagen Dari Daging Teripang Gamma. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 18(2): 150 - 161
- Astiana, I., Nurjanah, dan T. Nurhayati. 2016. Karakteristik Kolagen Larut Asam Dari Kulit Ikan Ekor Kuning. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 19 (1): 79 - 93
- [AOAC] Association of Official Analytical Chemist. 2012. *Official Methods of Analysis*. Washington DC(US): Association of Official Analytical Chemist Inc.
- Devi, HLNA., P. Suptijah, dan M. Nurilmala. 2017. Efektifitas Alkali dan Asam terhadap Mutu Kolagen dari Kulit Ikan Patin. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 20(2): 255 - 265
- Djailani, F., W. Trilaksani, dan T. Nurhayati. 2016. Optimasi Ekstraksi Dan Karakterisasi Kolagen Dari Gelembung Renang Ikan Cunang Dengan Metode asam Hidro-ekstraksi. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 19(2): 156 - 167
- Fawzya, Y.N., E.Chasanah, A.Poernomo, dan M.H. Khirzin. 2016. Isolasi Dan Karakterisasi Parsial Kolagen Dari Teripang Gamma (*Stichopus variegatus*). *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*. 11(1): 91 - 100
- Gadi, D.S., W. Trilaksani, dan T. Nurhayati, 2017. Histologi, Ekstraksi Dan Karakterisasi Kolagen Gelembung Renang Ikan Cunang *Muarenesox talabon*. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis*. 9(2): 665 - 683
- Kartika, I.W., W. Trilaksani, dan I Ketut M. Adnyane. 2016. Karakterisasi Kolagen Dari Limbah Gelembung Renan Ikan Cunang Hasil Ekstraksi Asam dan Hidrotermal. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 19(3): 222 - 232
- Kittiphattanabawon, P., S. Benjakul, W. Visessanguan, T. Nagai, dan M. Tanaka. 2005. Characterization Of Acid - Soluble Collagen From Skin And Bone Of Bigeye Snapper (*Priacanthus tayenus*). *Food Chemistry*. 89: 363 - 372.
- Kittiphattanabawon, P., S. Benjakul, W. Visessanguan, dan F. Shahidi. 2010. Isolation and characterization of collagen from the certilages of brownbanded bamboo shark (*Chiloscyllium punctatum*) and blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*). *Food Sci Tech*. 43: 792 -800
- Kumar, M.H, V. Spandana, T.Poonam. 2011. Extraction And Detrmination Collagen Peptide And Its Clinical Importance From Tilapia Fish Scales (*Oreochromis niloticus*). *International Research Journal Of Pharmacy*. 2(10): 97 - 99
- Krishnamoorthi, J, P. Ramasamy, V. Shanmugam, dan A. Shanmugam. 2017. Isolation And Partial Characterization Of Collagen From Outer Skin Of Sepiapharaonis (Ehrenberg, 1831) From Puducherry Coast. *Biochemistry and Biophysics Reports of Journal*. 39 - 45.
- Mayasari, 2016. Ekstraksi Kolagen Optimum Dari Kulit Ikan Tuna (*Thunnus sp.*) Sebagai Antioksidan. [Skripsi]. Departemen Kimia. Fakultas MIPA - IPB
- Muyonga, J.H., CGB. Cole, dan K.G. Duodu. 2004. Characterisation Of Acids Soluble Collagen From Skins Of Young And Adult Nile Perch (*Lates niloticus*). *Food Chemistry*. 85: 81-89.
- Nollet L. 1996. *Handbook of Food Analysis Amino*. New York (US): Marcel Dekker.
- Sari, E.M., M. Nurilmala, dan A. Abdullah. 2017. Profil Asam Amino dan Senyawa Bioaktif Kuda Laut *Hippocampus comes*. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis*. 9(2): 605 - 617
- Tridhar, N.A. 2016. Perbandingan Produksi Kolagen Dari Sisik Dan Tulang Ikan Gurami (*Osphronemus gouramy*) Secara Kimia Dan Enzimatis. Skripsi. Program Studi Teknologi Pangan Fakultas Teknik Universitas Pasundan. Bandung.
- Naro, A.B, L. Sahubawa, dan N. Ekantari. 2013. Ekstraksi dan Karakterisasi Kolagen Dari Kulit Ikan Nila Hitam (*Oreochromis niloticus*). *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*. 8(2): 171 - 180

- Nurilmala, M., A.M. Jacob, dan R.A. Dzaky. 2017. Karakteristik Gelatin Kulit Ikan Tuna Sirip Kuning. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 20(2): 340 - 350
- Nurhayati, Tazwir, dan Murniyati. 2013. Ekstraksi dan Karakterisasi Kolagen Larut Asam Dari Kulit Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*). *Komunikasi Ringkas. Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*. 8(1): 85 - 92
- Samosir, A.S. Kristina, N. Idiawati, dan L. Destiarti. 2018. Ekstraksi Gelatin Dari Kulit Ikan Toman (*Channa micropelthes*) Dengan Variasi Konsentrasi Dari Asam Asetat. *Jurnal Kimia Khatulistiwa*. 7(3): 104 - 108
- Wang W, Li Z, Liu J, Wang Y, Liu S, Sun M. 2013. Comparison Between Thermal Hydrolysis And Enzymatic Proteolysis Processes For The Preparation Of Tilapia Skin Collagen Hydrolysate. *Journal of Food Science*. 31(1): 1 - 4.
- Wulandari, 2016. Karakterisasi Fisikokimia Kolagen Yang Diisolasi Dengan Metode Hidro-Ekstraksi Dan Stabilisasi Nanokolagen Kulit Ikan Gabus (*Channa Striata*). Tesis. Sekolah Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor.