

EKSTRAKSI DAN KARAKTERISASI KOLAGEN DARI DAGING TERIPANG GAMMA

Extraction and Characterization of Collagen from Sea Cucumber Flesh

Alhana*, Pipih Suptijah, Kustiariyah Tarman

Departemen Teknologi Hasil Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan,
Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Dramaga, Jalan Agatis, Bogor 16680 Jawa Barat
Tlp. (0251) 8622909-8622906, Faks. (0251) 8622907

*Korespondensi: al_hana_chan@yahoo.com

Diterima: 10 Juni / Disetujui: 1 Agustus 2015

Abstrak

Teripang gamma (*Stichopus variegatus*) merupakan salah satu biota laut filum Echinodermata yang tersebar luas di perairan Indonesia dan berpotensi sebagai sumber kolagen. Penelitian bertujuan untuk mengkaji karakteristik fisikokimia kolagen daging *S. variegatus*. Rendemen kolagen yang diperoleh sebesar 1,50% (bb) diekstrak melalui *pretreatment* dengan NaOH 0,30%, hidrolisis dengan CH₃COOH 0,10% dan ekstraksi dengan aquades. Kadar protein, air dan abu kolagen berturut-turut: 67,68%, 13,64% dan 4,15%. Kolagen yang diekstrak dengan pemanasan 45°C selama 2 jam masih memiliki struktur *triple helix*; pH 7,37; suhu puncak pelelehan 163,67°C dan derajat putih 69,25%. Asam amino utama pada kolagen yaitu glisina, alanina, prolina dan asam glutamat.

Kata kunci: NaOH, kolagen, *Stichopus variegatus*, FTIR.

Abstract

Sea cucumber (*Stichopus variegatus*) is one of the Echinodermata phylum that grows along Indonesian coastal. Sea cucumber is potential source of collagen. The purposes of this research were to determine the optimal concentration of NaOH and CH₃COOH solution in collagen production and analyze the physicochemical characteristics of collagen from *S. variegatus*. Yield of the collagen was 1.5% (based on wet weight basis), produced by *pretreatment* with NaOH 0,30%, hydrolysis with CH₃COOH 0.10% and extracted using distilled water. Protein, moisture, and ash content of the collagen was 67.68%, 13.64%, and 4.15%, respectively. Collagen was extracted using distilled water at 45°C during 2h and still had *triple helix* structure; pH 7.37; melting temperature 163.67°C and whiteness 69.25%. The major amino acid content of collagen were glycine, alanine, proline and glutamic acid.

Keywords: NaOH, collagen, *Stichopus variegatus*, FTIR.

PENDAHULUAN

Kolagen merupakan salah satu kelompok protein yang tidak larut air, yang keberadaannya mencapai 30% dari seluruh protein penyusun tubuh manusia. Peranan kolagen dalam tubuh manusia sebagai

struktur organik pembangun tulang, gigi, sendi, otot dan kulit. Secara alamiah sedikitnya 1% kolagen dalam tubuh manusia hilang setiap tahun sehingga pada usia 30 tahun manusia kehilangan kolagen sekitar 15-20% dan pada usia 40 tahun

manusia tidak memproduksi kolagen lagi sehingga kolagen yang hilang mencapai 35-40%. Penurunan jumlah kolagen juga berkaitan dengan hormon estrogen yang berperan mengubah fibroblas menjadi kolagen. Kerusakan kolagen pada kulit dapat disebabkan oleh paparan radiasi UV-A dan UV-B dari sinar matahari. Kandungan kolagen dalam tubuh manusia berkurang seiring dengan bertambahnya usia (Draelos dan Thaman 2006). Salah satu solusi untuk mengurangi dampak negatif tersebut yaitu aplikasi kolagen dalam berbagai produk kosmetik dan obat.

Kolagen dapat diekstrak dari kulit (Ahmad dan Benjakul 2010; Singh *et al.* 2010; Kittiphattanabawon *et al.* 2005), sisik (Li *et al.* 2008; Matmaroh *et al.* 2011; Zhang *et al.* 2011), dan tulang (Kittiphattanabawon *et al.* 2005). Ekstraksi kolagen dapat dilakukan secara kimiawi maupun kombinasi secara kimiawi dan enzimatis. Ekstraksi secara kimiawi dapat melalui proses asam atau basa. Proses asam cocok digunakan untuk bahan baku yang memiliki struktur kolagen dengan sedikit ikatan silang, misalnya babi dan kulit ikan; sedangkan proses basa umumnya digunakan untuk bahan baku yang memiliki ikatan silang lebih padat dan kompleks seperti tulang dan kulit sapi (Karim dan Bhat 2009). Zhou dan Regenstein (2005) menunjukkan *pretreatment* untuk menghilangkan protein nonkolagen menggunakan NaOH dengan konsentrasi 0,01 mol/L OH dan 0,1 mol/L OH. Deproteinasi kulit dan tulang bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*) menggunakan 0,1 N NaOH 1:10 (b/v) selama 6 jam dilanjutkan dengan defatted dengan butil alkohol 10% 1:10 (b/v) selama 18 jam, kemudian kolagen diekstrak dengan CH₃COOH 0,5 M 1:30 (b/v) selama 24 jam (Kittiphattanabawon *et al.* 2005).

Kolagen juga dapat diekstrak dengan kombinasi asam dan enzim. Beberapa jenis enzim yang dapat digunakan adalah pepsin, tripsin, pankreatin, fisin, bromelin dan papain (Skierka dan Sadowska 2007).

Kolagen yang paling banyak dipasarkan umumnya berasal dari jaringan kulit dan tulang sapi ataupun babi yang keamanan dan kehalalannya perlu diwaspadai, sehingga diperlukan alternatif sumber kolagen yang aman dan halal. Teripang gamma adalah salah satu biota perairan yang berpotensi sebagai sumber kolagen. Saito *et al.* (2002) menyatakan bahwa 70% dinding tubuh teripang mengandung kolagen. Potensi tersebut perlu dikembangkan dan diaplikasikan menjadi produk berbasis kolagen yang aman digunakan.

Penggunaan kolagen berkaitan dengan karakteristik fisikokimia diantaranya adalah sifat antigenitas rendah, afinitas dengan air tinggi, tidak beracun, biocompatible and biodegradable, relatif stabil, dapat disiapkan dalam berbagai bentuk sesuai kebutuhan dan mudah dilarutkan dalam air maupun asam (Lee *et al.* 2001). Pengembangan produk berbasis kolagen perlu didukung oleh kualitas kolagen yang memiliki karakteristik dan mutu sesuai standar. Penelitian mengenai optimasi ekstraksi dan karakterisasi fisikokimia kolagen dari daging *S. variegatus* perlu dilakukan, mengingat karakteristik kolagen dari sumber yang berbeda memiliki karakteristik yang berbeda pula. Hasil penelitian ini dapat mendukung pengembangan lebih lanjut terkait aplikasi kolagen dari biota perairan pada produk pangan maupun nonpangan. Penelitian ini bertujuan menentukan konsentrasi NaOH dan CH₃COOH terbaik untuk ekstraksi kolagen serta menentukan karakteristik fisik dan kimia kolagen dari daging *S. variegatus*.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Bahan utama yang digunakan pada penelitian adalah daging *S. variegatus*. Bahan-bahan yang digunakan untuk ekstraksi kolagen terdiri dari NaOH (Merck), CH₃COOH (Merck), dan akuades. Alat-alat yang digunakan adalah *freeze dryer* (Christ Alpha 2-4 LD UK), pH meter, kromameter CR-310 (Minolta CR-310 Tokyo Japan), *Atomic Absorption Spectrophotometer* (AA6300 Shimadzu Japan), *High Performance Liquid Chromatography* (Water Cooperation USA), *Fourier Transform Infrared Spectrophotometer* (Bruker Tensor 37 German), dan *Differential Scanning Calorimetry* (DSC-60 Shimadzu Kyoto Japan).

Prosedur Penelitian

Preparasi Karakterisasi Daging *S. variegatus*

Bagian luar *S. variegatus* dibersihkan dari kotoran yang menempel dan dipisahkan daging dari kulit dan jeroannya. Daging teripang gamma yang telah dibersihkan dari kotoran dan jeroan dianalisis proksimat (AOAC 2005) serta logam beratnya (Hg dan Pb) (BSN 2006) dan As (BSN 1998).

Optimasi Ekstraksi Kolagen (modifikasi Cui *et al.* 2007)

Pembuatan kolagen melalui 3 tahap, yaitu *pretreatment* daging *S. variegatus* menggunakan larutan NaOH untuk menghilangkan protein nonkolagen, lemak, protein, mineral dan pigmen; hidrolisis dengan larutan asam asetat (CH₃COOH) dan ekstraksi kolagen dengan akuades. Proses deproteinasi dengan larutan NaOH dan hidrolisis dalam larutan CH₃COOH masing-masing dilakukan selama 48 jam pada suhu *chilling*. *Pretreatment* dilakukan dalam larutan

NaOH dengan rasio daging dan larutan NaOH adalah 1:10 (b/v). Konsentrasi NaOH yang digunakan yaitu 0,05% ; 0,10% ; 0,20% dan 0,30%. Larutan NaOH sisa perendaman daging diuji kandungan proteinnya secara kuantitatif dengan uji biuret. Daging hasil *pretreatment* dicuci dengan air mengalir sampai mencapai pH netral.

Hasil *pretreatment* pada daging *S. variegatus* dilanjutkan dengan proses hidrolisis dalam larutan CH₃COOH menggunakan konsentrasi 0,10% dan 0,30% dengan rasio daging dengan larutan asam asetat adalah 1:10 (b/v). Daging hasil perendaman CH₃COOH dicuci dengan air mengalir sampai mencapai pH netral sebelum dilanjutkan pada tahap ketiga yaitu ekstraksi dengan akuades selama 2 jam dengan rasio daging dan akuades adalah 1:2 (b/v) pada suhu 45°C untuk menghindari degradasi kolagen menjadi gelatin. Hasil ekstrak berupa kolagen yang dikeringkan dengan *freeze dryer*.

Karakterisasi Fisikokimia dan Logam Berat Kolagen

Karakteristik fisik meliputi rendemen, analisis termal dengan *Differential Scanning Calorimetry* (DSC) (Martianingsih dan Atmaja 2009), derajat putih dengan kromameter dan gugus fungsi dengan FTIR (Munyonga *et al.* 2004). Karakteristik kimia meliputi proksimat (AOAC 2005), logam berat Hg, Pb dan As dengan AAS (BSN 1998, BSN 2006), pH dan asam amino dengan HPLC (AOAC 1995).

Analisis Data

Rancangan yang digunakan untuk tahap perendaman dalam larutan NaOH adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan model matematis seperti terlihat pada Persamaan 1. Perlakuan merupakan konsentrasi NaOH. Semua perlakuan dilakukan sebanyak tiga kali ulangan (Steel dan Torrie 1993).

Model rancangan adalah:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \epsilon_{ij} \quad (\text{Persamaan 1})$$

Keterangan:

$$i = 1, 2, 3, \text{ dan } 4$$

$$j = 1, 2, \text{ dan } 3$$

Y_{ij} = respon pengaruh konsentrasi NaOH ke-i ulangan ke-j

μ = nilai tengah umum

τ_i = pengaruh konsentrasi NaOH ke-i

ϵ_{ij} = pengaruh acak pada konsentrasi NaOH ke-i ulangan ke j

Rancangan yang digunakan untuk rendemen kolagen adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Perlakuan merupakan kombinasi antara konsentrasi NaOH dan konsentrasi asam asetat. Semua perlakuan dilakukan sebanyak tiga kali ulangan.

Model rancangan adalah:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \epsilon_{ij} \quad (\text{Persamaan 1})$$

Keterangan:

$$i = 1, 2, 3, 4, 5, \text{ dan } 6$$

$$j = 1, 2, \text{ dan } 3$$

Y_{ij} = respon pengaruh perlakuan ke-i ulangan ke-j

μ = nilai tengah umum

τ_i = pengaruh perlakuan ke-i

ϵ_{ij} = pengaruh acak pada perlakuan ke-i ulangan ke j.

Data yang diperoleh dianalisis dengan analisis ragam (ANOVA) dan apabila

hasilnya berbeda nyata dilanjutkan dengan uji *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf kepercayaan 95%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik Daging *S. variegatus*

Karakteristik kimia dan logam berat dari daging *S. variegatus* disajikan pada Tabel 1. Daging teripang gamma memiliki kadar air yang tinggi dibandingkan teripang *Stichopus hermannii* (teripang alam) (88,56%) dan teripang budidaya (92,89%) (Andirisnanti 2012). Kandungan protein pada daging teripang lebih rendah dibandingkan dinding tubuh *Stichopus japonicus* (3,3%) dan kulit hiu *Chiloscyllium punctatum* (Saito *et al.* 2002; Kittiphattanabawon *et al.* 2010).

Kadar lemak dan abu daging *S. variegatus* lebih kecil dibandingkan dengan kulit hiu *C. punctatum* (Kittiphattanabawon *et al.* 2010; Mehmet *et al.* 2011). Keberadaan lemak dan abu pada daging *S. variegatus* perlu dihilangkan melalui optimasi proses *pretreatment* guna meningkatkan kualitas kolagen. Shon *et al.* (2011) menyatakan bahwa keberadaan lemak dan mineral lainnya akan mengganggu efektivitas kolagen dalam aplikasinya pada berbagai produk.

Tabel 1 Komposisi kima dan logam berat daging teripang gamma

Parameter uji	Jumlah		
	Hasil penelitian	Teripang (Mehmet <i>et al.</i> 2011)	Kulit hiu (Kittiphattanabawon <i>et al.</i> 2010)
Komposisi kimia			
Air (%)	93,84 ± 0,09	82,00 – 92,60	61,96
Protein (%)	2,69 ± 0,028	2,50 – 13,80	24,75
Abu (%)	2,66 ± 0,120	1,50 – 4,30	12,12
Lemak (%)	0,18 ± 0,006	0,10 – 0,90	0,19
Logam berat			
Pb (mg/kg)	< 0,005*	-	-
Hg (mg/kg)	< 0,002*	-	-
As (mg/kg)	< 0,002*	-	-

Keterangan: *limit deteksi AAS

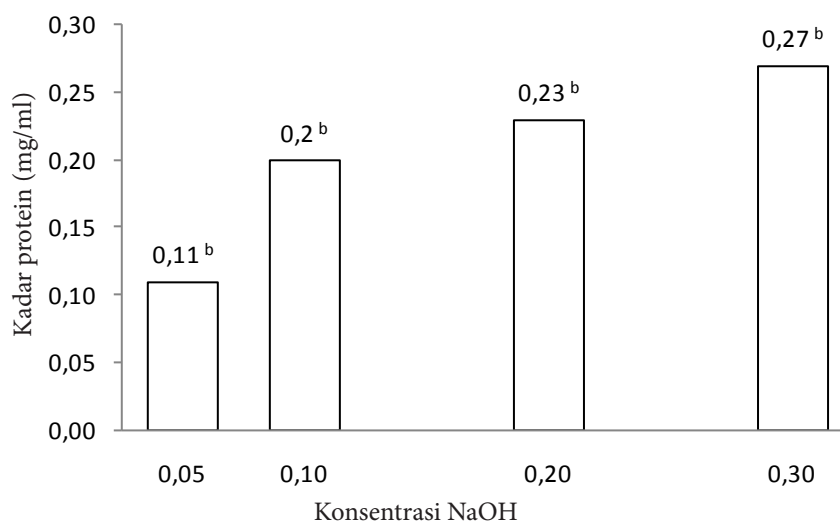
Berdasarkan hasil uji (Tabel 1), kandungan logam berat Pb, Hg dan As pada daging *S. variegatus* masih berada dibawah ambang batas kandungan logam berat dari ikan dan hasil olahannya yang ditetapkan oleh BSN (2009) yaitu Pb = 0,3 mg/kg ; Hg = 0,5 mg/kg ; dan As = 1,0 mg/kg, sehingga daging *S. variegatus* aman digunakan sebagai bahan baku produk turunan berbasis kolagen.

Optimasi Ekstraksi Kolagen

Hasil analisis sidik ragam, diketahui bahwa perlakuan konsentrasi larutan NaOH berpengaruh nyata terhadap kandungan protein terlarut. Dari hasil uji DMRT, terlihat bahwa kandungan protein terlarut pada perlakuan konsentrasi larutan NaOH berbeda nyata ($\alpha=0,05$) kecuali antara perlakuan konsentrasi NaOH 0,10% dan 0,20%, sehingga perlakuan konsentrasi NaOH yang dilanjutkan untuk tahap selanjutnya, yaitu proses hidrolisis adalah 0,05%; 0,10%; dan 0,30%. Perlakuan konsentrasi larutan NaOH 0,30% mengandung protein terlarut yang lebih besar dibandingkan

tiga perlakuan lainnya (Gambar 1), artinya protein nonkolagen yang terbuang dari perlakuan NaOH 0,30% lebih banyak dibandingkan dua perlakuan lain.

Zhou dan Regenstein (2005) menyatakan penggunaan larutan basa pada proses *pretreatment* lebih efektif dalam proses ekstraksi protein nonkolagen dan hanya menyebabkan tingkat kehilangan kolagen yang rendah dibandingkan dengan penggunaan larutan asam. Ekstraksi senyawa nonkolagen terjadi akibat terputusnya sebagian ikatan antar serat pada struktur kolagen dalam kondisi basa (Hinterwaldner 1977). Proses hidrolisis dilakukan menggunakan asam untuk mengubah struktur serat kolagen sehingga akan mempermudah proses ekstraksi pada tahap selanjutnya. Jaswir *et al.* (2011) mengatakan bahwa penggunaan asam membantu peningkatan H^+ yang mengakibatkan air lebih mudah berpenetrasi ke dalam serat kolagen melalui gaya elektrostatis antara gugus polar atau ikatan hidrogen dan antara gugus nonpolar dan atom (hidrasi liotropik).



Gambar 1 Kadar protein terlarut dalam larutan NaOH sisa perendaman daging *S. variegatus*

Karakteristik Kolagen Rendemen

Rendemen menunjukkan keefektifan proses ekstraksi. Rendemen kolagen *S. variegatus* yang dihasilkan dari perlakuan konsentrasi NaOH dan CH₃COOH dapat dilihat pada Gambar 2.

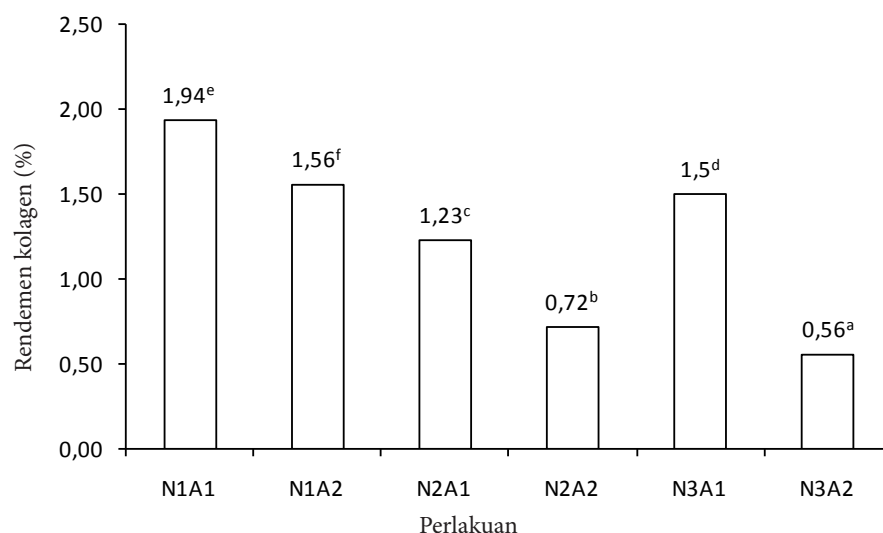
Perlakuan konsentrasi NaOH dan CH₃COOH (NA) memberikan pengaruh berbeda nyata terhadap rendemen kolagen yang dihasilkan ($\alpha=0,05$). Kolagen dengan tiga rendemen tertinggi diperoleh dari perlakuan N1A1 (1,94%), N1A2 (1,56%), dan N3A1 (1,50%). Tiga perlakuan dengan rendemen tertinggi (N1A1, N1A2, dan N3A1) dianalisis lebih lanjut untuk menentukan perlakuan terbaik berdasarkan komposisi kimia dan logam beratnya.

Komposisi Kimia dan Logam Berat

Komposisi kimia dan logam berat kolagen *S. variegatus* dapat dilihat pada Tabel 2. Hasil Uji DMRT menunjukkan bahwa kadar protein pada perlakuan N1A1 berbeda nyata dengan perlakuan

N1A2 tetapi tidak berbeda nyata dengan perlakuan N3A1 ($\alpha=0,05$). Perlakuan NA tidak memberikan pengaruh nyata terhadap kadar air kolagen ($\alpha=0,05$), karena semua perlakuan kolagen dikeringkan secara bersamaan menggunakan *freeze dryer*. Kadar abu N1A1 berbeda nyata dengan perlakuan N1A2 dan N3A1. Kadar abu yang rendah sangat diharapkan untuk mendapatkan kolagen berkualitas terbaik. Kandungan Pb, Hg dan As dari kolagen N1A1, N2A1 dan N3A1 berada di bawah batas maksimum cemaran logam berat yang ditetapkan oleh BSN (2014), sehingga aman digunakan untuk aplikasi pada produk pangan maupun nonpangan.

Berdasarkan hasil analisis komposisi kimia dan logam berat kolagen dengan RAL, mutu kolagen terbaik dihasilkan dari perlakuan N3A1 (Tabel 2) karena memiliki kadar protein tinggi dan abu yang paling rendah. Kandungan protein *S. variegatus* lebih kecil dibandingkan kolagen kulit ikan pari (86,97%), serta kadar air 11,78% dan abu 0,17% (Nur'aenah 2012). Kolagen daging *S. variegatus* mengandung kadar



Gambar 2 Rendemen kolagen (bb) dari perlakuan beberapa konsentrasi

Keterangan: NaOH 0,05% dan CH₃COOH 0,10% (N1A1), NaOH 0,05% dan CH₃COOH 0,30% (N1A2), NaOH 0,10% dan CH₃COOH 0,10% (N2A1), NaOH 0,10% dan CH₃COOH 0,30% (N2A2), NaOH 0,30% dan CH₃COOH 0,10% (N3A1), NaOH 0,30% dan CH₃COOH 0,30% (N3A2)

Tabel 2 Komposisi kimia dan logam berat dari kolagen *S. variegatus*

Parameter uji	Satuan	Kolagen			Syarat mutu kolagen (BSN 2014)
		N1A1	N1A2	N3A1	
Protein	%	68,54 ± 0,59a	63,66 ± 0,84b	67,68 ± 0,42a	≥ 75
Air	%	13,65 ± 0,16a	12,27 ± 0,12a	13,64 ± 0,26a	≤ 12
Abu	%	6,70 ± 0,36a	5,33 ± 0,16b	4,15 ± 0,47c	≤ 1
Pb	mg/kg	< 0,005*	< 0,005*	< 0,005*	≤ 0,4
Hg	mg/kg	< 0,002*	< 0,002*	< 0,002*	≤ 0,5
As	mg/kg	< 0,002*	< 0,002*	< 0,002*	≤ 1

Keterangan: *limit deteksi AAS

protein lebih rendah, kadar abu dan air lebih tinggi dari syarat mutu kolagen yang ditetapkan oleh BSN (2014).

Analisis Gugus Fungsi dengan FTIR

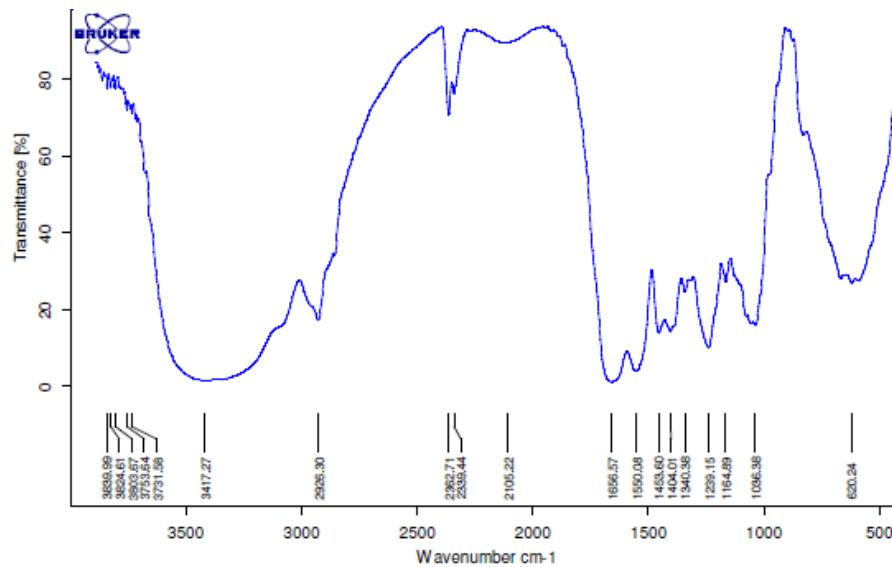
Hasil *Fourier Transform Infrared Spectrophotometer* (FTIR) kolagen terbaik (N3A1) menunjukkan puncak-puncak serapan tersebar pada wilayah serapan amida A, amida B, amida I, amida II, dan amida III (Gambar 3). Keberadaan amida A dan B pada kolagen *S. variegatus* ditunjukkan pada bilangan gelombang 3417,27 cm^{-1} dan 2926,30 cm^{-1} (Tabel 3). Coates (2000) menyatakan bahwa serapan amida B ini terbentuk dari asimetrikal stretching CH_2 dengan wilayah serapan antara 2935-2915 cm^{-1} . Puncak amida I kolagen *S. variegatus* ditemukan pada bilangan gelombang 1656,57 cm^{-1} . Menurut Kong dan Yu (2007), amida I memiliki wilayah serapan pada kisaran

1690-1600 cm^{-1} yang menunjukkan vibrasi stretching C=O. Frekuensi bilangan gelombang amida I berkaitan dengan struktur sekunder protein. Muyonga *et al.* (2004) menyatakan bahwa amida I terdiri dari empat komponen struktur sekunder protein, yaitu α -heliks, β -sheet, β -turn, dan random coil yang saling bertumpang tindih. Kong dan Yu (2007) menyatakan bahwa komponen α -heliks ditunjukkan pada wilayah serapan antara 1654 dan 1658 cm^{-1} ; β -sheet pada = 1624-1642 cm^{-1} ; β -turn pada = 1666, 1672, 1680, 1688 cm^{-1} ; dan *random coil* pada = 1648±2 cm^{-1} . Berdasarkan puncak serapan Amida I (1656,57 cm^{-1}), kolagen *S. variegatus* memiliki struktur α -heliks.

Spektra amida A dan amida I kolagen dari sisik *grass carp* amida A dan amida I ditemukan pada bilangan gelombang 3323 cm^{-1} dan 1654 cm^{-1} (Li *et al.* 2008). Kolagen dari kulit young *Lates niloticus* memiliki bilangan gelombang amida A

Tabel 3 Wilayah serapan FTIR kolagen

Amida	Bilangan gelombang (cm^{-1})	Wilayah serapan (cm)	Keterangan	Referensi
Amida A	3417,27	3440-3400	vibrasi <i>stretching</i> NH	Sai dan Babu (2001)
Amida B	2926,30	2935-2915	asimetrikal <i>stretching</i> CH_2	Coates (2000)
Amida I	1656,57	1690-1600	vibrasi <i>stretching</i> C=O	Kong dan Yu (2007)
Amida II	1550,08	1575-1480	CN <i>sterching</i> , NH <i>bending</i>	Kong dan Yu (2007)
Amida III	1239,15	1301-1229	CN <i>sterching</i> , NH <i>bending</i>	Kong dan Yu (2007)



Gambar 3 Spektra FTIR kolagen

dan amida I pada 3434 cm^{-1} dan 1650 cm^{-1} (Muyonga *et al.* 2004). Perbedaan band yang ditemukan diduga karena adanya perbedaan spesies dan struktur molekul kolagen (Matmaroh *et al.* 2011).

Hasil spektra FTIR menunjukkan bahwa amida II dan III kolagen hasil penelitian berturut-turut memiliki bilangan gelombang $1550,08\text{ cm}^{-1}$ dan $1239,15\text{ cm}^{-1}$. Amida III ditemukan pada bilangan gelombang $1301\text{-}1229\text{ cm}^{-1}$ yang menunjukkan interaksi intermolekuler pada kolagen yang berkaitan dengan CN *stretching* dan NH *bending* (Kong dan Yu 2007).

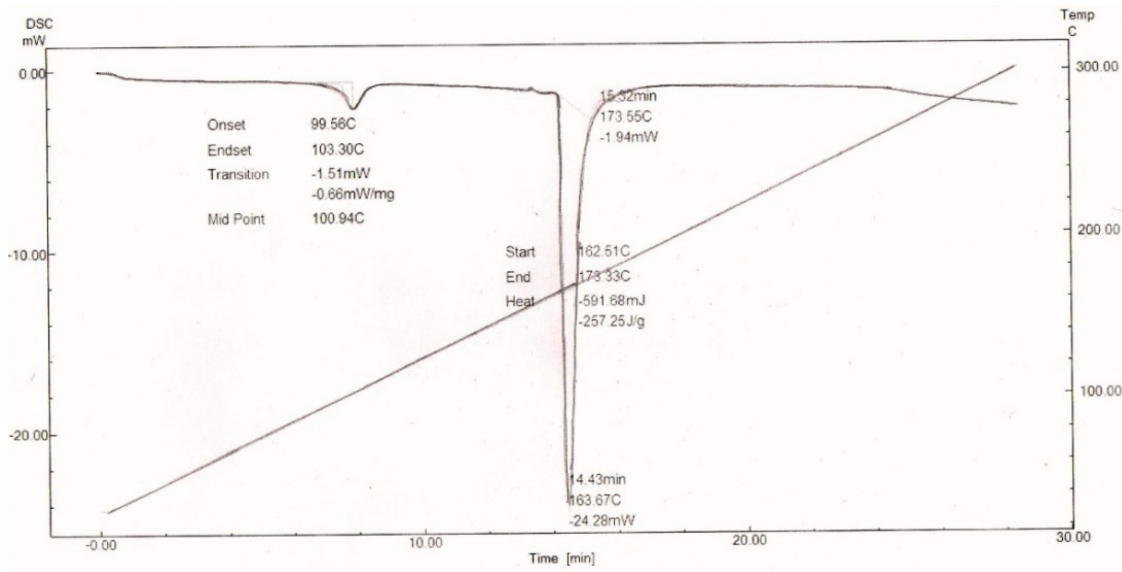
Intensitas rasio antara band amida III dan band 1450 cm^{-1} adalah 1,17. Intensitas rasio tersebut menunjukkan struktur *triple helix* pada kolagen. Nilai rasio yang mendekati 1,0 menandakan bahwa kolagen tersebut memiliki struktur *triple helix* (Matmaroh *et al.* 2011). Kolagen yang dihasilkan tidak terdegradasi menjadi gelatin yang ditandai dengan masih terdapatnya struktur *triple helix*. Proses kerusakan ikatan hidrogen dan kovalen karena pemanasan $>45^{\circ}\text{C}$ mengakibatkan terganggunya stabilitas struktur *triple helix* kolagen sehingga terjadi perubahan

bentuk menjadi gulungan dan akhirnya kolagen terdegradasi menjadi gelatin (Gómez-Guillén *et al.* 2011).

Analisis Termal

ngga terjadi perubahan bentuk menKurva termogram *Differential Scanning Calorimetry* (DSC) kolagen terbaik (N3A1) *S. variegatus* memiliki dua puncak eksotermis. Puncak eksotermis ke I menunjukkan transisi gelasi dari kolagen akibat terputusnya ikatan hidrogen yang mengarah pada pembentukan polimer amorf yaitu gelatin, dimana transisi gelasi kolagen terjadi pada suhu $100,94^{\circ}\text{C}$. Puncak eksotermis ke II merupakan suhu transisi maksimum yang menunjukkan puncak melting bahan. Kolagen memiliki T_{max} pada suhu $163,67^{\circ}\text{C}$, sedangkan suhu awal dan akhir pelelehannya berturut-turut: $162,51^{\circ}\text{C}$ dan $173,33^{\circ}\text{C}$ (Gambar 4).

Ahmad dan Benjakul (2010) mengatakan penggunaan CH_3COOH mengakibatkan terputusnya ikatan hidrogen intramolekul yang merupakan penstabil struktur *triple helix* kolagen. Menurut Samouillan *et al.* (2011), bentuk akhir kolagen juga berpengaruh terhadap



Gambar 4 Kurva termogram DSC kolagen *S. variegatus*

suhu denaturasi kolagen. Kolagen tipe I dari urat sapi dalam bentuk terliopilisasi menunjukkan Tmax yang lebih tinggi dibandingkan dalam bentuk *hydrated* dengan suhu berturut-turut 225°C dan 78,3°C.

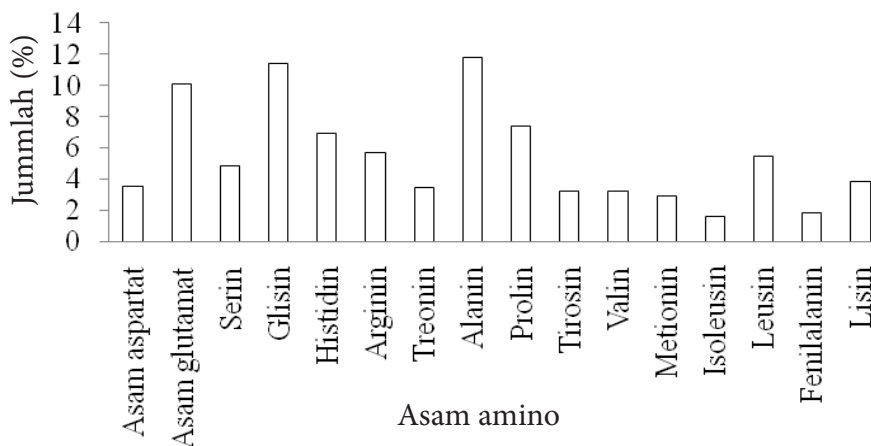
pH

Hasil pengukuran pH menunjukkan bahwa kolagen terbaik (N3A1) *S. variegatus* bersifat netral (7,37) karena setelah *pretreatment* dengan NaOH dan hidrolisis dengan CH₃COOH dilakukan proses netralisasi. Netralisasi mempengaruhi pH akhir kolagen karena proses tersebut dapat mengurangi residu

asam maupun basa setelah perendaman. Proses penetralan yang baik menghasilkan pH akhir yang mendekati pH netral. Nilai pH kolagen sesuai dengan standar kolagen yang ditetapkan oleh BSN (2014) dengan kisaran nilai 6,5-8. Peng *et al.* (2004) melaporkan nilai pH pada beberapa merk kolagen berkisar antara 3,8-4,7. Perbedaan nilai pH kolagen tersebut dapat disebabkan perbedaan jenis dan konsentrasi asam atau basa yang digunakan selama perendaman.

Derajat Putih

Warna kolagen merupakan salah satu karakter fisik yang menentukan kualitas. Kolagen berkualitas baik memiliki



Gambar 5 Komposisi asam amino pada kolagen daging *S. variegatus*

warna dasar putih dengan derajat putih mendekati 100%. Hasil pengukuran menunjukkan kolagen perlakuan terbaik (N3A1) *S. variegatus* memiliki derajat putih 69,01%. Shon *et al.* (2011) menyatakan bahwa kolagen dari kulit ikan pari (Raja kenoei) memiliki derajat putih 88,4%. Kolagen dan nanopartikel kolagen dari kulit ikan pari memiliki derajat putih yang berbeda masing-masing: 72,48% dan 60,03% (Nur'aenah 2012). Perbedaan warna kolagen berkaitan dengan tingkat efektivitas proses *pretreatment* yaitu pelepasan pigmen selama proses perendaman dengan NaOH.

Komposisi Asam Amino

Komposisi asam amino yang utama pada kolagen daging *S. variegatus* yaitu glisina (11,35%), alanina (11,78%), asam glutamat (10,10%) dan prolina (7,41%) (Gambar 5). Molekul dasar kolagen terbentuk dari tiga rantai polipeptida yang saling berpilin membentuk struktur *triple helix* dengan susunan asam amino yang khas yaitu Gly-X-Y, pada posisi X adalah prolin dan posisi Y adalah hidroksiprolin (Friess 1998). Cui *et al.* (2005) menyatakan bahwa *pepsin solubilized collagen* (PSC) dari *S. japonicus* memiliki kandungan glisin 32,87%, alanin 11,06%, dan prolin 9,47%. Friess (1998) menyatakan bahwa asam amino glisin terdapat pada setiap posisi ketiga susunan asam amino triple heliks kolagen (Gly-X-Y), dimana 35% dari asam amino penyusun triple heliks kolagen merupakan prolin dan hidroksiprolin. Glisin berperan dalam mengurangi hambatan sterik dan memicu interaksi ikatan hidrogen dalam rantai helix (Fontaine-Vive *et al.* 2009).

Kolagen dari *S. variegatus* mengandung isoleusin dan fenilalanin dalam jumlah kecil yaitu 1,58% dan 1,88%. Asam glutamat yang tinggi pada kolagen tidak hanya terkandung pada daging *S. variegatus*, tetapi juga *Pepsin-*

solubilized collagen (PSC) dari *S. japonicus* yaitu 10,90% dan 10,39% (Saito *et al.* 2002; Cui *et al.* 2007).

KESIMPULAN

Kolagen daging *S. variegatus* memiliki rendemen 1,5% (bb) yang diproduksi dengan perlakuan terbaik, yaitu konsentrasi larutan NaOH 0,3% dan larutan asam asetat 0,1%. Kolagen mengandung air 13,64%; protein 67,68%; abu 4,15%; derajat putih 69,25%; suhu puncak pelelehan 163,67°C dan pH 7,37. Kandungan logam berat (Pb, Hg, As) berada di bawah limit deteksi AAS. Kolagen memiliki struktur *triple helix*. Komposisi asam amino utama pada kolagen *S. variegatus* adalah glisin, alanin, prolin dan asam glutamat.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad M, Benjakul S. 2010. Extraction and characterisation of pepsin solubilized collagen from the skin of unicorn leather jacket (*Aluterus monoceros*). *The Journal of Food Chemistry* 120: 817-824.
- Andirisnanti WA. 2012. Uji manfaat ekstraksi kolagen kasar dari teripang *Stichopus hermanni* sebagai bahan pelembab kulit [tesis]. Jakarta (ID): Universitas Indonesia.
- [AOAC] Association of Official Analytical Chemist. 1995. Official Method of Analysis of The Association of Official Analytical of Chemist. Arlington (US) : Published by The Association of Official Analytical Chemist. Inc.
- [AOAC] Association of Official Analytical Chemist. 2005. Official Methods of Analysis (18 Edn). Mayland (US): Published by The Association of Official Analytical Chemist Inc.
- [BSN] Badan Standardisasi Nasional. 1998. Cara uji cemaran arsen dalam makanan: SNI 4866-1998. Jakarta: Badan Standardisasi Nasional.

- [BSN] Badan Standardisasi Nasional. 2006. Cara uji kimia Bagian 6: Penentuan kadar logam berat merkuri (Hg) pada produk perikanan: SNI 2354-2006. Jakarta: Badan Standardisasi Nasional.
- [BSN] Badan Standardisasi Nasional. 2006. Cara uji kimia Bagian 7: Penentuan kadar logam berat timbal (Pb) pada produk perikanan: SNI 2354-2006. Jakarta: Badan Standardisasi Nasional.
- [BSN] Badan Standardisasi Nasional. 2009. Batas maksimum cemaran logam berat dalam pangan: SNI 7387-2009. Jakarta: Badan Standardisasi Nasional.
- [BSN] Badan Standardisasi Nasional. 2014. Kolagen kasar dari sisik ikan- Syarat mutu dan pengolahan: SNI 8076-2014. Jakarta: Badan Standardisasi Nasional.
- Coates J. 2000. Interpretation of infrared spectra, a practical approach. Di dalam: Meyers RA, editor. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd.
- Cui FX, Xue CH, Li ZJ, Zhang YQ, Dong P, Fu XY, Gao X. 2007. Characterization and subunit composition of collagen from the body wall of sea cucumber *Stichopus japonicus*. *The Journal of Food Chemistry* 100:1120-1125.
- Draelos ZD dan Thaman LA. 2006. *Cosmetic Science and Technology Series. Volume ke-30, Cosmetic Formulation of Skin Care Products*. New York: Taylor & Francis Group.
- Fontain-Vive F, Merzel F, Johnson MR, Kearley GJ. 2009. Collagen and component polypeptides: Low frequency and amide vibrations. *Chemical Physics* 355:141-148.
- Friess W. 1998. Collagen – biomaterial for drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 45:113-136.
- Gómez-Guillén MC, Giménez B, López-Caballero ME, Montero MP. 2011. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *The Journal of Food Hydrocolloids* 25:1813-1827.
- Hinterwaldner R. 1977. Raw material. Di dalam: Ward AG dan Courts A, editor. *The Science and Technology of Gelatin*. New York: Academic Press.
- Jaswir I, Monsur HA, Salleh HM. 2011. Nano-structural analysis of fish collagen extracts for new process development. *African Journal of Biotechnology* 10(81):18847-18854.
- Karim AA dan Bhat R. 2009. Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. *The Journal of Food Hydrocolloid* 23:563-576.
- Kittiphattanabawon P, Benjakul S, Visessanguan W, Nagai T, Tanaka M. 2005. Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). *The Journal of Food Chemistry* 89:363-372.
- Kittiphattanabawon P, Benjakul S, Visessanguan W, Kishimura H, Shahidi F. 2010. Biomedical applications of collagen. Isolation and Characterisation of collagen from the skin of brownbanded bamboo shark (*Chiloscyllium punctatum*). *The Journal of Food Chemistry* 119:1519-1526.
- Kołodziejska I, Skierka E, Sadowska M, Kołodziejski W, Niecikowska C. 2008. Effect of extracting time and temperature on yield of gelatin from different fish offal. *The Journal of Food Chemistry* 107:700-706.
- Kong J, Yu S. 2007. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 39(8):549-559.
- Lee CH, Singla A, Lee Y. 2001. Biomedical applications of collagen. *International Journal of Pharmaceutics* 221:1-22

- Li CM, Zhong ZH, Wan QH, Zhao H, Gu HF, Xiong SB. 2008. Preparation and thermal stability of collagen from scales of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *European Food Research and Technology* 227(5):1467–1473.
- Martianingsih N dan Atmaja L. 2009. Analisis sifat kimia, fisik, dan termal gelatin dari ekstraksi kulit Ikan pari (*Himantura gerrardi*) melalui variasi jenis larutan asam. Prosiding KIMIA FMIPA – ITS.
- Matmaroh K, Benjakul S, Prodpran T, Encarnacion A, Kishimura H. 2011. Characteristics of acid soluble collagen and pepsin soluble collagen from scale of spotted golden goatfish (*Parupeneus heptacanthus*). *The Journal of Food Chemistry* 129:1179–1186.
- Mehmet A, Hüseyin S, Bekir T, Yilmaz E, Sevim K. 2011. Proximate composition and fatty acid profile of three different fresh and dried commercial sea cucumbers from Turkey. *International Journal Food Science Technology*. 46: 500–508.
- Muyonga JH, Cole CGB, Duodu KG. 2004. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). *The Journal of Food Chemistry* 86:325–332.
- Nur'aenah N. 2012. Ekstraksi dan Karakterisasi kolagen dan nanopartikel kolagen dari kulit ikan pari (*Pastinachus solocirostris*) sebagai bahan baku kosmetik [tesis]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Peng Y, Glattauer V, Werkmeister JA, Ramshaw JAM. 2004. Evaluation for collagen products for cosmetic application. *The Journal of Cosmestic Science* 55:327–341.
- Sai KP dan Babu M. 2001. Studies on Rana tigerina skin collagen. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 128(1):81–90.
- Samouillan V, Delaunay F, Dandurand J, Merbahi N, Gardou JP, Yousfi M, Gandaglia A, Spina M, Lacabanne C. 2011. The Use of thermal techniques for the characterization and selection of natural biomaterials. *The Journal of Functional Biomaterials* 2:230–248.
- Saito M, Kunisaki N, Urano N, Kimura S. 2002. Collagen as the major edible component of sea cucumber. *The Journal of Food Science* 67:1319–1322.
- Shon J, Ji-Hyun E, Hwang SJ, Jong-Bang E. 2011. Effect of processing conditions on functional properties of collagen powder from Skate (*Raja kenoei*) skins. *The Journal of Food Science Biotechnology* 20(1):99–106.
- Singh P, Benjakul S, Maqsood S, Kishimura H. 2010. Isolation and characterisation of collagen extracted from the skin of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *The Journal of Food Chemistry* 124:97–105.
- Skierka E dan Sadowska M. 2007. The influence of different acids and pepsin on the extractability of collagen from the skin of Baltic cod (*Gadus morhua*). *The Journal of Food Chemistry* 105:1302–1306.
- Steel RGD dan Torrie JH. 1993. Prinsip dan Prosedur Statistika, Suatu Pendekatan Biometrik. Sumantri B, penerjemah. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama. Terjemahan dari: Principles and Procedures of Statistics.
- Zhang F, Wang A, Li Z, He S, Shao L. 2011. Preparation and Characterisation of collagen from Freshwater Fish Scales. *The Journal of Food and Nutrition Science* 2:818–823.
- Zhou P dan Regenstein JM. 2005. Effects of alkaline and acid pretreatments on alaska pollock skin gelatin extraction. *The Journal of Food Science* 70(6): 392–396.