

## EKSTRAKSI KOLAGEN KULIT IKAN TUNA SIRIP KUNING (*Thunnus albacares*) MENGUNAKAN ENZIM PEPSIN DAN PAPAIN

**Nurjanah, Taufan Ichza Baharuddin, Tati Nurhayati\***

Departemen Teknologi Hasil Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan IPB University

Diterima: 24 April 2021/Disetujui: 20 Juni 2021

\*Korespondensi: [nurhayati7870@yahoo.com](mailto:nurhayati7870@yahoo.com)

**Cara sitasi:** Nurjanah, Baharuddin TI, Nurhayati T. 2021. Ekstraksi kolagen kulit ikan tuna sirip kuning (*Thunnus albacares*) menggunakan enzim pepsin dan papain. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 24(2): 174-187.

### Abstrak

Kolagen merupakan senyawa protein rantai panjang yang tersusun atas asam amino alanina, arginina, lisina, glisina, prolina, serta hidroksiprolina. Kolagen merupakan protein jaringan ikat yang dapat dihasilkan dari limbah kulit ikan. Tujuan penelitian ini untuk menentukan karakteristik kolagen yang diekstraksi dengan metode enzimatik. Metode penelitian terbagi menjadi dua tahap yaitu tahap ekstraksi enzim pepsin dari lambung ikan tuna sirip kuning dan tahap ekstraksi kolagen kulit tuna dengan metode enzimatik. Enzim pepsin yang diekstraksi dari lambung tuna sirip kuning memiliki nilai aktivitas spesifik 8.680 U/mg. Waktu perendaman dengan NaOH terbaik adalah 12 jam. Waktu hidrolisis kulit dengan asam asetat terbaik adalah 72 jam. Kolagen larut papain memiliki bobot molekul 310 kDa, gugus fungsi amida A, B, I, II, dan III, dengan rendemen 2,13%. Kolagen larut pepsin sebagian memiliki bobot 328 kDa, gugus fungsi amida A, I, II, dan III, dengan rendemen 0,8%.

Kata kunci: ekstraksi, kolagen, papain, pepsin

## Collagen Extraction of Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*) Skin Using Pepsin and Papain

### Abstract

Collagen is a long-chain protein rich in alanine, arginine, lysine, glycine, proline, and hydroxyproline. Collagen is a connective tissue protein that can be extracted from fish skin waste. The purpose of this study was to determine the characteristics of the collagen extracted by the enzymatic method. The research was divided into two stages, namely the extraction stage of the pepsin enzyme from the stomach of yellowfin tuna and the extraction stage of tuna skin collagen using the enzymatic method. The pepsin enzyme extracted from the stomach of yellowfin tuna had a specific activity value of 8,680 U/mg. The best soaking time with NaOH was 12 hours. Hydrolysis time of skin with acetic acid was 72 hours. Papain soluble collagen has a molecular weight of 310 kDa, amide functional groups A, B, I, II, and III, with a yield of 2,13%. Pepsin soluble collagen partly weighed 328 kDa, amide functional groups A, I, II, and III, with a yield of 0,8%.

Keyword: collagen, extraction, papain, pepsin

## PENDAHULUAN

Tuna (*Thunnus* sp.) merupakan ikan dengan nilai ekonomis tinggi baik dalam komoditas ekspor maupun konsumsi lokal. Ikan tuna terdiri dari tuna besar dan tuna kecil. Ikan tuna besar meliputi tuna sirip kuning (*Thunnus albacares*), tuna albakora (*Thunnus alalunga*), tuna mata besar (*Thunnus obesus*), dan tuna sirip biru (*Thunnus macoyii*) (Triharyuni dan Prisantoso 2012). Ikan tuna memiliki nilai ekspor terus meningkat setiap tahun. Ekspor ikan tuna mengalami peningkatan setiap tahunnya, yaitu mengalami kenaikan sebesar 13,5%, jika dibandingkan dengan tahun 2018 (KKP 2019). Limbah hasil pengolahan produk perikanan mencapai 20-60% dari bahan baku. Limbah pengolahan produk perikanan dengan bahan baku tuna terdiri dari bagian kepala 17%, kulit 8%, jeroan 5%, tulang 4%, dan sirip 2% (Sayana dan Siraajudheen 2017). Jeroan ikan dapat dimanfaatkan sebagai sumber enzim pepsin dan tripsin. Sumber enzim pepsin dapat diperoleh dari bagian lambung ikan, sedangkan bagian usus ikan dapat dimanfaatkan sebagai sumber dari enzim tripsin. Limbah produk perikanan berupa kulit dan tulang ikan mencapai 30%, dengan kandungan senyawa kolagen yang tinggi (Guillen *et al.* 2002). Komponen yang terdapat pada sisik dan kulit ikan antara lain 70% air, 27% protein, 1% lemak, dan 2% abu. Limbah kulit dan sisik ikan dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku pembuatan kolagen (Nagai *et al.* 2004).

Kolagen merupakan senyawa protein rantai panjang yang tersusun atas asam amino alanina, arginina, lisina, glisina, prolina, serta hidrosiprolina. Karakter kolagen antara lain mudah diserap dalam tubuh, tidak beracun, afinitas air tinggi, *biocompatible*, biodegradabel, relatif stabil, mudah dibentuk, dan dapat dilarutkan sehingga pemanfaatannya dalam bidang industri berkembang dengan pesat. Pemanfaatan kolagen dalam bidang kosmetik antara lain sebagai bahan tambahan dalam pembuatan produk perawatan rambut, wajah, dan tubuh (Peranginangin *et al.* 2015). Pemanfaatan kolagen menurut Silva *et al.* (2013) dapat dimanfaatkan dalam bidang kosmetik di

antaranya untuk perawatan antipenuaan dini, produk perawatan kulit serta dandanan (*make up*) dalam bentuk calir (*lotion*), gel, maupun bubuk.

Kolagen dapat dihasilkan dengan metode ekstraksi. Ekstraksi kolagen dapat dilakukan dengan metode kimiawi, fisik, dan enzimatik (Lin *et al.* 2010). Enzim yang sering digunakan dalam proses ekstraksi kolagen adalah enzim pepsin dan papain. Enzim papain merupakan enzim yang sudah banyak dikenal dan mudah didapatkan di pasaran serta berlabel halal karena bahan bakunya berasal dari tumbuhan pepaya (Wong 1989). Enzim pepsin merupakan enzim yang dapat diperoleh dari jeroan hewan, dan umumnya diperoleh dari jeroan babi. Kelemahan dari enzim pepsin adalah adanya sumber enzim pepsin yang tidak halal yaitu dari jeroan babi. Enzim pepsin yang beredar di pasaran didominasi oleh enzim pepsin yang bersumber dari jeroan babi, sehingga tidak dapat digunakan oleh seluruh masyarakat karena kehalalan dari bahan baku enzim pepsin. Penggunaan enzim dalam ekstraksi kolagen dapat meningkatkan jumlah rendemen yang diperoleh. Pamungkas *et al.* (2018) menyatakan bahwa rendemen kolagen yang diekstraksi menggunakan enzim pepsin lebih besar dibandingkan dengan ekstraksi kolagen dengan larutan asam. Ekstraksi kolagen menggunakan enzim pepsin diperoleh rendemen sebesar 1,94%, sedangkan ekstraksi kolagen dengan larutan asam memperoleh rendemen sebesar 0,94%. Hal ini mendorong peneliti untuk melakukan ekstraksi kolagen dari kulit ikan tuna menggunakan metode enzimatik. Penelitian ini bertujuan mengetahui nilai aktivitas spesifik enzim pepsin yang diekstraksi dari lambung ikan tuna serta menentukan karakteristik kolagen yang diekstraksi dengan metode enzimatik.

## BAHAN DAN METODE

### Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan pada bulan Juni sampai Desember 2020. Pelaksanaan penelitian dilakukan di Laboratorium Karakteristik Bahan Baku Hasil Perairan, Laboratorium Biomolekuler Hasil Perairan, Laboratorium Mikrobiologi Hasil Perairan, Departemen

Teknologi Hasil Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor, Laboratorium Instrumentasi Departemen Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor, dan Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan Jakarta.

### Bahan dan Alat

Bahan utama yang digunakan pada penelitian ini yaitu kulit dan lambung tuna. Kulit ikan tuna yang digunakan adalah kulit ikan tuna sirip kuning yang diperoleh dari daerah Gorontalo, Indonesia. Kulit tuna dikirimkan dari Gorontalo dalam keadaan beku, dan dalam kemasan plastik sebagai kemasan primer dan stereofom sebagai kemasan sekunder serta diberikan penambahan *gel ice* untuk mempertahankan suhu dingin lambung ikan tuna sirip kuning yang diperoleh dari PT Pahala Bahari Nusantara. Lambung ikan diperoleh dalam keadaan beku, dikemas dalam plastik dan stirofoam kemudian dibawa menuju laboratorium menggunakan transportasi darat. Sampel kulit dan lambung yang telah tiba di laboratorium kemudian disimpan ke dalam pembeku (*freezer*) untuk menjaga kondisi sampel. Bahan tambahan yang digunakan yaitu akuades, enzim papain (Merck, Jerman), nitrogen cair, *tris base* (SIGMA), hemoglobin sapi (SIGMA), TCA (Merck, Jerman), HCl, NaHCO<sub>3</sub> (Merck, Jerman), NaOH teknis (Merck, Jerman), asam asetat (CH<sub>3</sub>COOH) teknis (Merck, Jerman), dan NaCl teknis (Merck, Jerman).

Alat yang digunakan pada tahap ekstraksi kolagen terdiri dari sudip, erlenmeyer, gelas ukur, tabung reaksi, gelas arloji, wadah plastik, kain belacu, timbangan analitik (OHAUS A224), blender (Miyako), alat sentrifugasi (OHAUS FC5718R 120V), spektroskopi inframerah transformasi Fourier (Bruker Tensor 37), elektroforesis (PEQLab), pengering beku (Bio Base), dan spektrofotometer UV-VIS (RS spectrophotometer UV-2500).

### Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian ekstraksi kolagen dari kulit ikan tuna menggunakan metode enzimatis terbagi menjadi dua tahap. Tahap pertama adalah karakterisasi lambung tuna,

dan ekstraksi enzim pepsin lambung tuna. Tahap kedua adalah karakterisasi kulit tuna, ekstraksi kolagen dari kulit tuna dengan metode enzimatis, dan karakterisasi kolagen yang dihasilkan.

### Karakterisasi lambung tuna

Lambung dibersihkan dengan air mengalir untuk membersihkan lambung dari kotoran dan benda asing. Lambung yang telah dibersihkan dikemas dengan plastik polietilena dan disimpan dalam pembeku. Karakterisasi yang dilakukan pada lambung tuna sirip kuning adalah pengukuran morfometrik lambung tuna.

### Ekstraksi enzim pepsin (Bougatef *et al.* 2008)

Lambung tuna dipotong dengan ukuran kira-kira 1 cm. Lambung tuna kemudian diberikan nitrogen cair untuk memudahkan proses ekstraksi. Proses ekstraksi dilakukan dengan bufer tris-HCl pH 7,5 (1:2 b/v). Lambung tuna yang telah diekstraksi kemudian disentrifugasi selama 15 menit pada 10.000 g pada suhu 4 °C. Supernatan yang diperoleh disebut pepsinogen.

### Aktivasi enzim pepsin (Jurado *et al.* 2012)

Aktivasi pepsin dilakukan dengan menurunkan pH pepsinogen menjadi 2 dengan menambahkan HCl 3 N dan dibiarkan selama 10 menit, kemudian ditambahkan NaHCO<sub>3</sub> 2 N untuk meningkatkan pH menjadi 2,75. Sampel diendapkan selama 6 jam menghasilkan supernatan berupa larutan pepsin.

### Karakterisasi kulit tuna

Kulit tuna dibersihkan dengan air mengalir. Pembersihan kulit tuna bertujuan untuk menghilangkan kotoran dan benda asing. Kulit dibersihkan dari sisik dan daging yang masih tersisa. Kulit yang telah bersih kemudian dilakukan pengujian kadar air (SNI-01-28911992), kadar abu (SNI-01-28911992), kadar lemak (SNI-01-28911992), kadar protein (AOAC 2005), dan asam amino (Nollet 1996).

### Ekstraksi kolagen dengan metode enzimatis

Tahap praperlakuan sampel mengacu pada Tabarestani *et al.* (2012). Praperlakuan kulit ikan tuna bertujuan untuk menghilangkan protein nonkolagen. Proses ini dilakukan pada suhu 10 °C dengan merendam kulit ikan dalam larutan NaOH 0,1 M 1:10 (b/v) selama 12 jam dengan penggantian larutan setiap 2 jam. Larutan hasil perendaman kulit dengan NaOH dilakukan uji protein terlarut (Bradford 1976). Pengujian protein terlarut pada larutan rendaman bertujuan mengetahui waktu perendaman terbaik. Kulit ikan kemudian dicuci dengan akuades hingga pH kulit netral.

Tahap selanjutnya adalah tahap ekstraksi kolagen yang mengacu pada Nalinanon *et al.* (2007). Sampel hasil praperlakuan dihidrolisis dengan pelarut asam asetat 0,5 M. Perbandingan kulit dan pelarut yaitu 1:15 (b/v) pada suhu 10 °C. Tahap hidrolisis kulit dilakukan selama 3 hari, dengan pengamatan setiap hari. Kulit yang telah direndam ditimbang untuk mengetahui derajat pengembangan dan waktu hidrolisis terbaik

Ekstraksi kolagen dilakukan menggunakan enzim pepsin dan papain dengan konsentrasi 8.000 U/mg/g kulit. Rasio perbandingan kulit terhadap pelarut 1:15 (b/v) pada suhu ruang selama 5 hari. Ekstrak yang diperoleh kemudian disaring menggunakan kain saring hingga diperoleh filtrat. Filtrat yang diperoleh dilakukan penggumpalan menggunakan NaCl 1,8 M selama 12 jam. Hasil presipitasi pada ekstraksi kolagen dengan enzim pepsin dilakukan pemisahan. Endapan dipisahkan dari larutan kemudian dilakukan sentrifugasi. Filtrat dari hasil ekstraksi kolagen dengan enzim papain dan pepsin disentrifugasi dengan kecepatan 7.000 g selama 1 jam. Filtrat kolagen ditambahkan asam asetat 0,5 M dan didialisis dengan 0,1 M asam asetat dan akuades. Dialisis dilakukan menggunakan kantong dialisis berukuran 14 kDa. Kolagen yang didapatkan dilakukan proses pembekuan dalam lemari pembeku kemudian dikeringkan dengan pengering beku.

### Karakterisasi kolagen

Kolagen kemudian disimpan dalam wadah dan disimpan dalam pembeku. Kolagen yang dihasilkan kemudian dilakukan penimbangan bobot untuk mengetahui jumlah rendemen yang dihasilkan. Karakterisasi kolagen yang dilakukan meliputi uji gugus fungsi (Muyonga *et al.* 2004), asam amino (Nollet 1996), dan bobot molekul (Laemmler 1970).

### Prosedur Analisis

Analisis yang dilakukan yaitu, analisis proksimat, analisis kadar protein terlarut, analisis derajat pengembangan, dan karakterisasi kolagen. Karakterisasi kolagen yang dilakukan yaitu, analisis rendemen, analisis gugus fungsi, analisis asam amino, analisis bobot molekul, analisis kelarutan, dan analisis data.

### Pengukuran rendemen

Pengukuran rendemen diperoleh dari perbandingan kolagen yang dihasilkan terhadap berat bahan baku kulit. Banyaknya rendemen dapat dihitung dengan rumus:

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

### Analisis proksimat

Pengujian proksimat dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui komposisi kimia dari kulit tuna sirip kuning. Pengujian proksimat meliputi pengujian kadar air (BSN 1992), kadar abu (BSN 1992), kadar lemak (BSN 1992), dan kadar protein (AOAC 2005).

### Analisis aktivitas enzim (Bougatef *et al.* 2008)

Analisis aktivitas pepsin dilakukan menggunakan substrat *hemoglobin digestion*. Substrat dibuat dengan konsentrasi 2%, diberi penambahan triss-HCl pH 2. Substrat sebanyak 0,625 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dan ditambahkan pepsin 0,125 mL dan dilakukan inkubasi selama 15 menit dengan suhu 37 °C. Larutan kemudian ditambahkan TCA 10% sebanyak 0,4 mL dan disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 10.000 g dengan suhu 4 °C. Blangko dibuat dengan mencampurkan substrat dan akuades. Supernatan diambil dan ditentukan

nilai absorbansinya dengan panjang gelombang 280 nm. Satu unit aktivitas pepsin diartikan sebagai peningkatan 0,001 dalam 280 nm per menit, sehingga aktivitas pepsin dapat dinyatakan sebagai berikut:

$$A = (A_{280} - A_0) / (0,001 \times t \times VE)$$

A = aktivitas enzim dalam U per cm<sup>3</sup>

VE = volume larutan pepsin dalam uji aktivitas

A<sub>280</sub> = absorbansi pada 280 nm

t = waktu inkubasi (menit)

A<sub>0</sub> = absorbansi sampel yang dipreparasi dengan perlakuan yang sama tanpa penambahan pepsin ke substrat

### Analisis konsentrasi protein terlarut (Bradford 1976)

Analisis konsentrasi protein terlarut dilakukan dengan metode Bradford dengan standar *Bovine Serum Albumin* (BSA). Larutan Bradford terbuat dari campuran 10 mg *coomassie brilliant blue* (CBB) dengan 5 mL etanol 95%, kemudian ditambahkan 10 mL larutan asam fosfat 85% dan akuades hingga volume mencapai 500 mL. Larutan Bradford dihomogenkan kemudian disaring menggunakan kertas saring Whatman 1 dan disimpan dalam botol gelap pada suhu *chilling*.

Analisis protein dilakukan dengan 0,1 mL sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 5 mL larutan Bradford. Larutan dihomogenkan dan diinkubasi selama 10 menit lalu diukur absorbansi dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm. Absorbansi standar protein dibuat ke dalam kurva kemudian ditentukan konsentrasi protein terlarut.

### Derajat pengembangan (Saito *et al.* 2007)

Derajat pengembangan kulit diperoleh dari selisih berat kulit setelah proses hidrolisis dibandingkan dengan berat kulit awal (sebelum proses hidrolisis). Nilai derajat pengembangan dapat diperoleh sebagai berikut:

$$DP (\%) = (B - A) / A$$

A = berat kulit sebelum proses hidrolisis

B = berat kulit sesudah proses hidrolisis

### Analisis gugus fungsi (Muyonga *et al.* 2004)

Analisis gugus fungsi khas pada kolagen dilakukan menggunakan prinsip spektrofotometer inframerah transformasi Fourier (FTIR). Kolagen sebanyak 2 mg ditumbuk halus dengan KBr 100 mg. Campuran kolagen dicetak dalam cetakan pelet. Pelet yang dihasilkan kemudian dikeluarkan dari cetakan dan diletakkan pada tablet holde untuk dilakukan pengukuran dengan alat FTIR. Sinar inframerah ditembakkan dari spektrofotometer inframerah IR-408 nm pada kolagen yang telah berbentuk pelet. Pendeteksian gugus fungsi dapat dihasilkan pada monitor yang akan menampilkan puncak-puncak serapan bilangan gelombang.

### Analisis asam amino (Nollet 1996)

Analisis asam amino dilakukan terhadap sampel dan larutan standar asam amino. Sampel kolagen 0,1 g dilarutkan 5 mL HCl 6 N, di-vortex, kemudian dihidrolisis selama 22 jam pada suhu 110 °C. Sampel hasil hidrolisis didinginkan dan dipindahkan ke labu ukur 50 mL, serta ditetapkan hingga tanda batas. Sampel disaring menggunakan filter 0,45 µm. Filtrat 500 µL ditambahkan dengan 40 µm *α-Aminobutyric acid* (AABA) dan 460 µL akuabides. Larutan sebanyak 10 µL ditambahkan dengan 70 µL *JaccQ-Fluor Borate*, kemudian dihomogenkan. Larutan ditambahkan dengan 20 µL reagen fluor A hingga homogen kemudian inkubasi pada suhu 55 °C selama 10 menit. Sampel diinjek pada bagian HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) kemudian dilakukan *running* pengujian.

Analisis larutan standar dilakukan dengan mencampurkan 40 µL standar asam amino dengan 40 µL internal standar AABA dan 920 µL akuabides, kemudian dihomogenkan. Standar sebanyak 10 µL dipipet dan ditambahkan dengan 70 µL *AccQ-Fluor Borate* kemudian dihomogenkan. Larutan ditambahkan 20 µL reagen fluor A hingga homogen kemudian inkubasi pada suhu 55 °C selama 10 menit.

$$\text{Asam amino (\%)} = \frac{\text{Luas area sampel} \times C \times F_p \times B_M \times 100\%}{\text{Luas area standar} \times \text{Bobot sampel}}$$

Keterangan :

C=Konsentrasi standar asam amino ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

Fp=Faktor pengenceran

BM=Bobot molekul dari masing-masing asam amino ( $\text{g}/\text{mol}$ )

### Analisis bobot molekul (Laemmli 1970)

Sampel sebanyak 2 mg dilarutkan dalam 1 mL natrium dodesil sulfat (SDS) 5% dan campuran diinkubasi pada suhu 85 °C selama 1 jam. Campuran disentrifugasi pada 4.000 g selama 5 menit pada suhu ruang. Supernatan yang diperoleh dicampur dengan bufer (Tris HCl 60 mM, pH 6,8 mengandung 2% SDS dan 25% gliserol) dengan rasio 1:1 (v/v) dan mengandung 10%  $\beta$ -merkaptoetanol ( $\beta$ -ME). Campuran dipanaskan dalam air mendidih selama 2 menit. Sampel sebanyak 5  $\mu\text{L}$  dimasukkan ke dalam gel poliakrilamida. Gel poliakrilamida terdiri dari 7,5% *running* gel dan 3% *stacking* gel. Penanda (*marker*) yang digunakan yaitu penanda protein dengan bobot molekul 10-250 kDa. Elektroforesis dijalankan pada arus 13 mA dan tegangan 100 volt selama 2 jam. Gel dikeluarkan dari lempeng (*slab*) kaca kemudian dilakukan proses pewarnaan (*staining*) dan *destaining*. Proses pewarnaan dilakukan dengan *coomasie blue* selama 1 jam, sedangkan proses *destaining* selama kurang lebih 2 jam hingga pita-pita protein terlihat jelas.

### Rancangan Percobaan dan Analisis Data

Rancangan percobaan yang digunakan pada tahap praperlakuan kulit tuna, yaitu tahap deproteinasi dan hidrolisis kulit tuna. Rancangan acak lengkap dengan satu faktor yaitu perbedaan perlakuan yang diberikan dan terdiri dari dua kali ulangan. Faktor perlakuan adalah lama waktu perendaman pada tahap praperlakuan dan hidrolisis. Data dianalisis dengan uji lanjut Duncan dengan menggunakan perangkat lunak *Statistical Package for Social Science* (SPSS).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Morfometrik lambung tuna sirip kuning

Hasil pengukuran morfometrik lambung tuna ( $n=8$ ) menunjukkan bahwa lambung

tuna memiliki bobot  $16,38\pm 4,87$  g, panjang  $11,69\pm 1,96$  cm, tebal  $0,56\pm 0,24$  cm, diameter  $2,86\pm 0,70$  cm, dan tinggi  $3,88\pm 0,83$  cm. Hasil ini berbeda dengan penelitian Ichسانی (2020) yang menggunakan lambung ikan tuna sirip kuning dengan bobot  $310\pm 108,70$  g, panjang  $36,4\pm 3,10$  cm, tebal  $0,62\pm 0,37$  cm, dan diameter  $10,7\pm 0,93$  cm. Perbedaan ukuran lambung dapat disebabkan karena perbedaan umur dan makanan serta nutrisi dari ikan tuna sirip kuning. Ukuran lambung tuna dapat dipengaruhi oleh asupan nutrisi ikan dan dapat berpengaruh terhadap rendemen pepsin yang dihasilkan (Moyle & Cech 2014). Ikan tuna adalah ikan golongan karnivora dengan mangsa ikan kecil, udang, dan cumi. Kapasitas isi perut sebesar 7% dari bobot tubuhnya (Miazwir 2012). Lambung tuna sirip kuning berpotensi sebagai sumber enzim pepsin dikarenakan ikan tuna tergolong ikan karnivora. Enzim pepsin dalam lambung tuna akan memotong protein yang diperoleh dari daging ikan-ikan kecil, udang dan cumi.

### Aktivitas Spesifik Enzim Pepsin

Nilai aktivitas enzim yang diperoleh adalah 1.373 U/mL, dengan nilai konsentrasi protein sebesar 0,158 mg/mL, sehingga diperoleh nilai aktivitas spesifik enzim pepsin 8.680 U/mg. Hasil ini lebih besar dari penelitian Ichسانی (2020) yang memperoleh nilai aktivitas pepsin dari lambung tuna sirip kuning 523,5 U/mL, dengan nilai konsentrasi protein 0,29 mg/mL, dan nilai aktivitas spesifik 1.805 U/mg. Hasil penelitian Nalinanon *et al.* (2010) menyatakan bahwa aktivitas ekstrak kasar pepsin dari tuna albakor sebesar 1.235 U/mL, dengan nilai konsentrasi protein 0,29 mg/mL, dan nilai aktivitas spesifik 4.258 U/mg. Perbedaan nilai aktivitas enzim dapat dipengaruhi oleh spesies, habitat, dan makanan ikan. Ekstraksi enzim dari lambung tuna dilakukan menggunakan bufer tris HCl pH 7,5. Proses ekstraksi pepsinogen harus memperhatikan pH larutan (dalam kondisi pH 7-7,5) untuk menjaga kestabilan enzim (Zhao *et al.* 2011). Penggunaan bufer tris pH 7 mampu menjaga kestabilan enzim selama proses ekstraksi (Jatmiko 2018).

## Komposisi Kimia Kulit Tuna Sirip Kuning

Analisis komposisi kimia bertujuan untuk mengetahui komposisi kimia dalam kulit tuna. Komposisi kimia sampel dapat dijadikan bahan untuk mengetahui kelayakan bahan baku pembuatan kolagen. Analisis yang dilakukan meliputi uji kadar air, kadar abu, kadar lemak, dan kadar protein. Hasil analisis proksimat dapat dilihat pada *Table 1*.

Kadar air kulit ikan tuna pada sampel maupun literatur pembanding memiliki nilai di atas 50%. Kadar air yang tinggi dapat berpengaruh terhadap kemunduran mutu produk. Semakin tinggi nilai kadar air maka bahan baku akan mudah mengalami proses kemunduran mutu. Kadar air dapat dipengaruhi oleh jenis spesies dari ikan serta musim penangkapan ikan (Shon *et al.* 2011)

Kadar abu kulit ikan tuna sirip kuning memiliki nilai yang lebih rendah dari pada literatur pembanding. Kadar abu dapat dipengaruhi oleh habitat dan jenis spesies. Kadar abu dapat dipengaruhi oleh banyaknya mineral yang diserap oleh tubuh dari habitat sekitar, semakin tinggi mineral yang terserap, maka kadar abu semakin tinggi (Kantun *et al.* 2015). Mineral yang terkandung dalam ikan antara lain Ca, K, Mg, Zn, Fe, dan Na (Effinong dan Fakunle 2011).

Kadar lemak kulit ikan tuna sirip kuning berbeda dengan literatur pembanding. Ikan dengan kandungan lemak lebih dari 4% tergolong ikan berlemak tinggi, sedangkan ikan dengan kandungan lemak kurang dari 4% tergolong berlemak rendah (Sun 2006). Kadar lemak yang tinggi dapat berpengaruh dalam tahap praperlakuan kulit ikan. Kulit dengan kadar air tinggi harus dilakukan tahap *defatting* terlebih untuk mengurangi kadar lemak dalam bahan.

Kadar protein yang diperoleh adalah 37,45%. Kadar protein dapat memengaruhi

jumlah rendemen kolagen yang akan dihasilkan. Kulit ikan dengan kadar protein yang tinggi akan memiliki jumlah kolagen yang banyak diperoleh (Oktaviani *et al.* 2017). Kadar protein dapat dipengaruhi oleh makanan, suhu, umur ikan, serta habitat ikan (Azara 2017).

## Praperlakuan Kulit Tuna Sirip Kuning

Tahap praperlakuan dilakukan dengan merendam kulit dalam larutan NaOH. Tujuan perendaman adalah untuk menghilangkan protein nonkolagen yang ada dalam kulit. Waktu praperlakuan terbaik dapat diketahui dengan uji protein terlarut, waktu praperlakuan dengan nilai protein terlarut terkecil dapat dipilih sebagai waktu praperlakuan terbaik. Konsentrasi protein terlarut dapat dilihat pada *Figure 1*.

Konsentrasi protein terlarut mengalami penurunan hingga perendaman 12 jam. Hasil penelitian Pertiwi (2006) menyatakan bahwa larutan NaOH 0,1 M dapat menurunkan konsentrasi protein terlarut dengan waktu perendaman selama 12 jam. Kenaikan konsentrasi protein pada waktu perendaman 14 jam dapat diakibatkan adanya protein lain yang terhitung, sehingga dipilih waktu perendaman terbaik selama 12 jam. Perendaman menggunakan NaOH apabila dilakukan lebih dari 12 jam dapat menyebabkan protein kolagen ikut terbuang. Penggunaan larutan NaOH berfungsi untuk menghilangkan protein nonkolagen dalam kulit tuna, semakin lama waktu perendaman maka semakin banyak protein nonkolagen yang akan hilang. Air rendaman NaOH yang semakin keruh disebabkan oleh adanya migrasi dari protein nonkolagen (Jaswir *et al.* 2011). Penggunaan larutan NaOH dalam proses praperlakuan bertujuan untuk menghilangkan protein nonkolagen dalam kulit ikan. Larutan NaOH dapat melepaskan

Table 1 Chemical composition of tuna skin

Fish	Moisture (%)	Ash (%)	Protein (%)	Lipid (%)
Yellow Fin Tuna	57.42±3.56	0.49±0.24	37.45±3.30	3.80±0.47
Yellow Fin Tuna <sup>1</sup>	59.38±1.20	2.21±0.06	36.45±0.50	1.15±0.09
Albacore Tuna <sup>2</sup>	56.54±0.09	4.39±0.03	20.54±0.26	18.32±0.11

Note: <sup>1</sup>Nurilmala *et al.* (2017), <sup>2</sup>Hema *et al.* (2013)

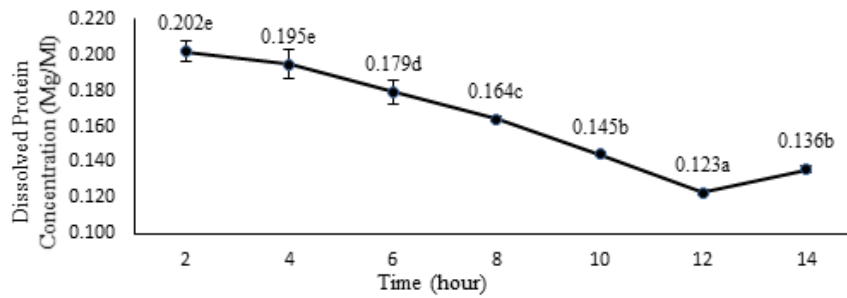


Figure 1 Dissolved protein concentration of yellow fin tuna skin

protein nonkolagen yang terperangkap dalam matriks dan melepaskan ikatan telopeptida yang menyatu (Liu *et al.* 2015).

### Hidrolisis Kulit Tuna Sirip Kuning

Hidrolisis kulit tuna sirip kuning dilakukan dengan merendam kulit dalam larutan asam asetat. Tahap hidrolisis kulit tuna sirip kuning bertujuan untuk membuat kulit tuna menjadi mengembang sehingga mempermudah penetrasi larutan pada tahap ekstraksi. Penentuan lama waktu hidrolisis terbaik dapat diketahui dengan melakukan uji derajat pengembangan, nilai derajat pengembangan tertinggi dapat dipilih sebagai waktu hidrolisis terbaik karena kulit mengembang secara maksimal. Hasil analisis derajat pengembangan dapat dilihat pada *Figure 2*.

Lama waktu perendaman terbaik adalah pada hari ke-3 atau selama 72 jam. Pemilihan waktu terbaik 3 hari (72 jam) karena pada pengamatan dan penimbangan bobot kulit di hari ke-5 kondisi kulit sudah mulai terpecah. Perendaman kulit tuna dalam asam asetat apabila dilakukan dalam waktu yang lama dapat menyebabkan kulit akan terpecah dan mengakibatkan protein kolagen akan larut dalam asam asetat. Penggunaan asam asetat dalam proses hidrolisis kulit berfungsi untuk

membuat kulit ikan menjadi mengembang dan memecah ikatan kolagen, sehingga kolagen akan mudah larut dan mudah diekstraksi (Liu *et al.* 2015). Perendaman kulit ikan tuna dengan asam asetat menyebabkan air mudah terserap ke dalam kolagen akibat adanya elektrostatik antara kolagen dengan ion  $H^+$  asam asetat (Jaswir *et al.* 2011). Konsentrasi asam asetat yang tinggi dan lama perendaman dapat menyebabkan jumlah air yang diserap oleh kulit ikan lebih banyak sehingga serat kolagen akan mudah dipisahkan (Nur'aenah 2013).

### Rendemen Kolagen

Ekstraksi kolagen kulit tuna sirip kuning dilakukan dengan metode enzimatik. Metode enzimatik dinilai dapat mempercepat waktu ekstraksi serta meningkatkan jumlah rendemen kolagen yang dihasilkan. Rendemen hasil ekstraksi kolagen menggunakan enzim pepsin dan papain dapat dilihat pada *Figure 3*.

Rendemen kolagen larut papain lebih tinggi dibandingkan dengan kolagen larut pepsin. Rendemen kolagen larut papain lebih rendah jika dibandingkan dengan penelitian sebelumnya. Ekstraksi kolagen menggunakan enzim papain memperoleh rendemen sebesar  $2,13 \pm 0,47\%$ . Rendemen kolagen larut papain yang diperoleh memiliki nilai yang lebih

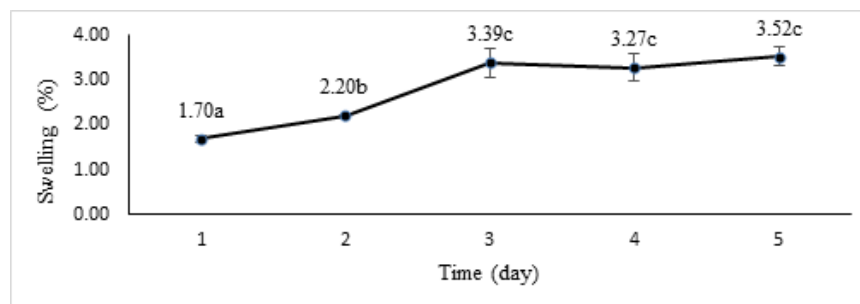


Figure 1 Swelling degree of yellow fin tuna skin



rendah jika dibandingkan dengan penelitian Nurilmala *et al.* (2019) dengan rendemen 22,79 %. Perbedaan hasil rendemen ekstraksi kolagen dapat dipengaruhi oleh karakteristik bahan baku, nilai aktivitas enzim, pH, lama waktu ekstraksi, dan suhu ekstraksi. Ekstraksi kolagen dengan enzim pepsin memperoleh rendemen sebesar  $0,80 \pm 0,01\%$ . Rendemen kolagen larut pepsin yang diperoleh memiliki nilai yang lebih kecil jika dibandingkan dengan penelitian Pamungkas *et al.* (2018) yang memperoleh rendemen sebesar 1,94%, dengan bahan baku sisik ikan haruan. Penggunaan enzim pepsin dalam proses ekstraksi kolagen dapat menyebabkan molekul *cross-linking* pada polipeptida terpecah tanpa merusak integritas *triple helix*. Perbedaan kulit ikan dalam pembuatan kolagen dapat berpengaruh terhadap jumlah rendemen kolagen yang diperoleh. Perbedaan komposisi kimia dalam kulit ikan dapat memengaruhi rendemen yang diperoleh, semakin besar nilai kadar protein dalam sampel, maka rendemen yang diperoleh akan semakin besar (Oktaviani *et al.* 2017).

### Gugus Fungsi Kolagen

Gugus fungsi kolagen dapat diketahui dengan uji FTIR. Spektroskopi FTIR merupakan teknik analisis untuk mengetahui gugus fungsi pada suatu senyawa misalnya kolagen. Setiap frekuensi sinar memiliki bilangan gelombang tertentu. Gugus fungsi penyusun kolagen memiliki daerah serapan khusus sesuai dengan karakter pada masing-masing gugus. Karakteristik kolagen kulit ikan tuna sirip kuning dengan enzim papain dan pepsin dapat dilihat pada *Table 2*.

Gugus fungsi kolagen terdiri dari gugus fungsi amida A, B, I, II, dan III. Kolagen yang dihasilkan terdapat gugus fungsi amida A dengan daerah serapan 3500–3100 yang merupakan *stretching* dari gugus NH. Gugus Amida B hanya terdeteksi pada kolagen larut papain, sementara pada kolagen larut pepsin tidak. Gugus amida B terdapat pada wilayah serapan 2935–2915 (Coates 2000). Gugus Amida I memiliki daerah serapan 1690-1600 (Kong dan Yu 2007). Kolagen larut papain dan pepsin terdapat gugus amida I. Gugus amida I ditandai dengan adanya asam amino glisin dan prolin pada *triple helix* kolagen (Payne dan Veis 1998). Gugus amida II ditandai dengan ikatan gugus NH yang berpasangan pada gugus CN stretch (Shanmugam *et al.* 2012). Gugus amida II berada pada wilayah serapan dengan bilangan gelombang 1.575-1.480  $\text{cm}^{-1}$  (Kong dan Yu 2007).

Kolagen larut papain dan pepsin memiliki gugus amida II dengan panjang gelombang 1.552 dan 1.544,1. Kolagen yang dihasilkan terdapat gugus amida III, sesuai dengan standar. Gugus amida III dengan wilayah serapan dengan bilangan gelombang 1301-1229 (Kong dan Yu 2007). Gugus amida III memiliki karakteristik yang sama seperti gugus amida II yang ditandai dengan CN berpasangan pada NH dan memiliki hubungan terhadap struktur *triple helix* kolagen (Shanmugam *et al.* 2012). Gugus amida yang tidak terdeteksi dapat disebabkan karena komposisi kimia kulit tuna, konsentrasi enzim yang digunakan, suhu ekstraksi kolagen, serta perbedaan enzim yang digunakan dalam ekstraksi kolagen.

Table 2 Collagen functional groups characteristics

Functional groups	Sample				Arbsorption Area
	Papain Soluble Collagen	Pepsin Soluble Collagen	Papain Soluble Collagen <sup>1</sup>	Pepsin Soluble Collagen <sup>2</sup>	
Amide A	3,325	3,425.3	3,483	3,307	3500 – 3100 <sup>3</sup>
Amide B	2,925	not detected	2,933	2,945	2935 – 2915 <sup>4</sup>
Amide I	1,650	1,655.8	1,656	1,629	1690 – 1600 <sup>5</sup>
Amide II	1,552	15,441	1,525	1,544	1575 – 1480 <sup>5</sup>
Amide III	1,239	1,236.6	1,253	1,238	1301 – 12295

Note:<sup>1</sup>Nurilmala *et al.* (2019); <sup>2</sup>Pamungkas *et al.* (2010); <sup>3</sup>Sastrohamidjojo (2018); <sup>4</sup>Coates (2000); <sup>5</sup>Kong & Yu (2007)

Table 3 Collagen amino acid of Tuna skin composition

Amino Acid	Papain Soluble Collagen (%)	Pepsin Soluble Collagen (%)	Pepsin Soluble Collagen <sup>1</sup> (%)
L-Serine	3.01	1.73	2.71
L-Glutamic Acid	5.86	3.15	5.19
L-Phenilalanine	1.92	1.46	1.72
L-Isoleucine	1.10	1.41	0.79
L-Valine	1.92	1.64	1.41
L-Alanine	6.05	1.57	5.47
L-Arginine	6.06	1.68	6.37
Glycine	16.98	2.85	17.58
L-Lycine	2.18	1.60	1.82
L-Aspartic Acid	2.97	2.24	2.35
L-Leucine	2.43	2.04	1.91
L-Tyrosine	0.55	0.96	0.35
L-Proline	7.12	1.64	7.04
L-Threonine	3.06	1.73	2.48
L-Histidine	0.80	0.64	0.63

Note:<sup>1</sup>Nurilmala *et al.* (2019)

Perbedaan konsentrasi enzim yang digunakan dapat berpengaruh dalam gugus amida yang terdeteksi. Penelitian Nalinanon *et al.* (2010) yang menggunakan konsentrasi enzim 150 U/g kulit, menyatakan bahwa terdeteksi gugus fungsi amida A, B, I, II, dan III pada kolagen larut pepsin yang diperoleh. Kolagen larut pepsin kulit ikan haruan terdeteksi gugus amida A, B, I, II, dan III menggunakan konsentrasi enzim pepsin sebesar 0,1% (Pamungkas *et al.* 2018). Penggunaan konsentrasi enzim pepsin yang besar dapat berpengaruh dalam proses pemotongan rantai ikatan pada kolagen, konsentrasi enzim yang tinggi dapat menyebabkan rantai kolagen akan terpotong dan menyebabkan kolagen menjadi terhidrolisis lebih lanjut.

### Asam Amino

Asam amino dapat digunakan sebagai parameter penentu kualitas dari produk berbasis protein seperti kolagen. Kolagen memiliki kandungan 90% protein dengan 18 jenis asam amino (Kumar *et al.* 2011). Asam amino yang mendominasi dalam kolagen adalah alanina, arginina, glisina, prolina,

dan hidrosiprolina. Komposisi asam amino kolagen dapat dilihat pada *Table 3*.

*Table 3* menunjukkan hasil analisis asam amino pada kolagen larut papain dan kolagen larut pepsin. Komposisi asam amino kolagen didominasi oleh asam amino glisina dan prolina. Hasil ini sesuai dengan penelitian Bae *et al.* (2008) yang menyatakan bahwa kolagen didominasi oleh asam amino prolina dan glisina yang merupakan ciri utama kolagen. Glisina adalah asam amino sederhana, yang hanya memiliki gugus H pada rantai cabang R dan tidak memiliki isomer optik. Prolina merupakan asam amino kolagen yang berperan dalam menjaga struktural kolagen. Prolina memiliki peran dalam membentuk rantai *triple helix* pada kolagen (Scauhmann *et al.* 2013). Kandungan asam amino glisina dan prolina yang tinggi, serta kandungan tirosina dan histidina yang rendah dalam kolagen yang dihasilkan merupakan ciri dari kolagen tipe 1 (Nalinanon *et al.* 2010). Peran glisina dalam kolagen adalah membentuk rantai  $\alpha$ -*triple helix* pada kolagen. Asam amino prolina dan hidrosiprolina penting untuk struktural kolagen, karena

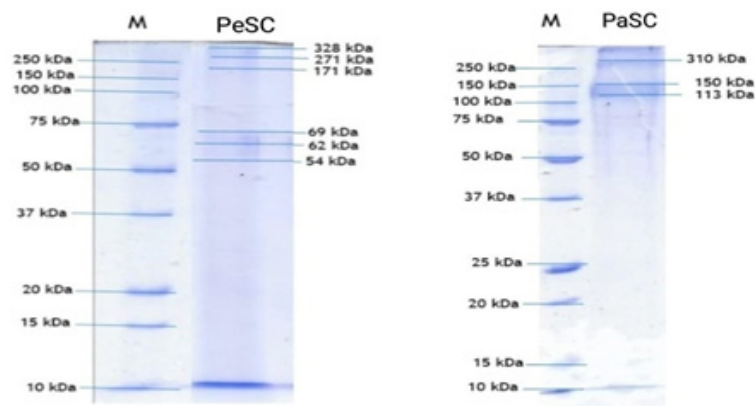


Figure 3 SDS-Page collagen (M = Marker, PeSC = Pepsin Soluble Collagen, PaSC= Papain Soluble Collagen)

berperan penting dalam pembentukan ikatan hidrogen intramolekul (Chi *et al.* 2014).

Asam amino glisina dan prolina pada kolagen larut pepsin lebih rendah dibandingkan dengan kolagen larut papain. Perbedaan jumlah glisina dan prolina dapat diakibatkan karena perbedaan penggunaan enzim serta konsentrasi enzim yang digunakan pada tahap ekstraksi kolagen. Enzim pepsin memiliki kemampuan untuk memotong rantai ikanan asam amino menjadi lebih kecil. Enzim pepsin menurut penelitian Singh *et al.* 2014 dapat memotong ikatan polipeptida pada kolagen. Penggunaan konsentrasi enzim pepsin yang tinggi dapat menyebabkan ikatan kolagen terhidrolisis lebih lanjut.

### Bobot Molekul

Pengujian bobot molekul kolagen dilakukan dengan metode SDS-Page. SDS-Page adalah metode pemisahan rantai polipeptida protein berdasarkan berat molekul dengan aliran arus listrik (Jaziri *et al.* 2017). Pengujian bobot molekul ditandai dengan adanya pita pada elektrogram. Hasil pengujian bobot molekul pada pepsin dan pepsinogen dapat dilihat pada *Figure 3*.

Bobot molekul protein kolagen larut papain yang dihasilkan memiliki 3 pita, yaitu  $\beta$ ,  $\alpha 1$ , dan  $\alpha 2$ . Struktur dasar kolagen terdiri dari *triple helix* dengan rantai kembar ( $\alpha 1$ ) dan ( $\alpha 2$ ) (Silvipriya 2015). Bobot molekul pada kolagen larut papain adalah  $\beta$  (310 kDa),  $\alpha 1$  (150 kDa), dan  $\alpha 2$  (113 kDa). Bobot molekul pada kolagen

larut pepsin adalah  $\beta$  (328 kDa) dan  $\alpha 1$  (171 kDa). Kolagen ditandai dengan bobot molekul yang tinggi yang meliputi komponen  $\beta$   $\alpha$  chain dimers. Rantai  $\beta$  menunjukkan adanya ikatan silang (*cross-linked*) pada kolagen (Chi *et al.* 2014). Enzim pepsin merupakan enzim yang dapat memecah molekul telopeptida dan tropokolagen. Konsentrasi enzim yang digunakan dapat memengaruhi struktur asam amino. Konsentrasi enzim yang tinggi dapat membuka struktur rantai asam amino, sehingga asam amino yang dihasilkan lebih banyak dan berantai pendek, sehingga bobot molekul menjadi kecil. Enzim pepsin menurut penelitian Singh *et al.* 2011 dapat memotong ikatan polipeptida pada kolagen. Komponen struktur  $\gamma$  kolagen yang mengandung telopeptida terdegradasi menjadi struktur  $\alpha 1$  dan  $\alpha 2$  sehingga intensitas pita  $\alpha 1$  dan  $\alpha 2$  meningkat pada kolagen larut pepsin Song *et al.* (2014).

### KESIMPULAN

Enzim pepsin yang diekstraksi dari lambung tuna sirip kuning memiliki nilai aktivitas spesifik 8.680 U/mg. Waktu perendaman dengan NaOH terbaik adalah 12 jam. Waktu hidrolisis kulit dengan asam asetat terbaik adalah 72 jam. Kolagen larut papain memiliki bobot molekul 310 kDa, gugus fungsi amida A, B, I, II, dan III, dengan rendemen 2,13%. Kolagen larut pepsin sebagian memiliki bobot 328 kDa, gugus fungsi amida A, I, II, dan III, dengan rendemen 0,8%.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini tentunya tidak akan terlaksana jika tidak terdapat dukungan baik secara finansial maupun moral dari beberapa pihak terkait. Oleh karena itu, kami ucapkan terima kasih kepada hibah Penelitian Terapan Unggul Perguruan Tinggi (PTUPT) KEMENRISTEKDIKTI atas dana hibah "Penelitian Terapan Unggulan Perguruan Tinggi (PTUPT) 2020" atas nama Prof. Dr. Tati Nurhayati, S.Pi M.Si.

## DAFTAR PUSTAKA

- [AOAC] Association of Official Analytical Chemist. 2005. *Official methods of analysis of the association of official analytical chemists*. Virginia (US): Association of Official Analytical Chemist Inc. Arlington.
- Azara R. 2017. Pembuatan dan analisis sifat fisikokimia gelatin dari limbah kulit ikan kerapu. *Jurnal Rekapangan*. 11(1): 62-69.
- Bae I, Osatomi K, Yoshida A, Osako K, Yamaguchi A, Hara K. 2008. Biochemical properties of acid-soluble collagens extracted from the skins of underutilized fishes. *Food Chemistry*. 108: 49-54.
- Bougatef A, Balti R, Zaeid SB, Souissi N, Nasri M. 2008. Pepsinogen and pepsin from the stomach of smooth hound (*Mustelus mustelus*): purification, characterization, and amino acid terminal sequences. *Food Chemistry*. 107: 777-784.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for qualification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 234-254.
- Chi CF, Cao ZH, Wang B, Hu FY, Li ZR, Zhang B. 2014. Antioxidant and functional properties of collagen hydrolysates from spanish mackerel skin as influenced by average molecular weight. *Molecules*. 19: 11211-11230.
- Gomez-guillen MC, MCJ Turnay, MD Fernandez-Diaz, N Ulmo, MA Lizarbe, P Montero. 2002 Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: A comparative study. *Food Hydrocolloids*. 16: 215-34.
- Effinong BN, Fakunle JO. 2011. Proximate and mineral composition of some commercially important fishes in Lake Kainji, Nigeria. *Journal of Basic and Applied Scientific Research*. 1(12): 2497-2500.
- Hema GS, Shyni K, Mthew S, Ananda R, Ninan G, Lakshmanan PT. 2013. A simple method for isolation of fish skin collagen-biochemical characterization of skin collagen extracted from albacore tuna (*Thunnus alalunga*), dog shark (*Scoliodon sorrakowah*), and rohu (*Labeo rohita*). *Annals of Biological Research*. 4(1): 271-278.
- Ichsani SP. 2020. Pepsin lambung tuna sebagai katalisaor peningkatan mutu pasta surimi ikan nila merah. [Skripsi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- 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.
- Jatmiko PD. 2018. Karakteristik ekstrak kasar pepsin ikan tuna sirip kuning (*Thunnus albacares*) [Skripsi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Jaziri AA, Sukoso, Firdaus M. 2017. Karakteristik protease dari ekstrak kasar khamir laut dan aktivitasnya dalam menghidrolisis protein ikan rucah. *Journal of Fisheries and Marine Science*. 1(2): 78-87.
- Jurado E, Vicaria JM, Lechuga M, Moya-Ramirez I. 2012. Pepsin extraction process from swine wastes. *Procedia Engineering*. 42: 1346-1350.
- Kantun W, Malik AA, Harianti. 2015. Kelayakan limbah padat tuna loin madidihang *Thunnus albacares* untuk bahan baku produk diversifikasi. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 18(3): 303-314.
- Kong J, Yu S. 2007. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 39(8): 549-559.
- Kumar MH, Spandana V, Poonam T. 2011. Extraction and determination of collagen

- peptide and its clinical importance from tilapia fish scales (*Oreochromis niloticus*). *International Research Journal of Pharmacy*. 2(10): 97-99.
- [KKP] Kementerian Kelautan dan Perikanan. 2018. *Statistik Kelautan dan Perikanan 2018*. Jakarta: KKP.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature*. 227: 680-685.
- Lin JY, Le GW, Wang JY, Li YX, Shi YH, Sun J. 2010. Antioxidative peptides derived from enzyme hydrolysis of bone collagen after microwave assisted acid pre-treatment and nitrogen protection. *International Journal of Molecular Sciences*. 11: 4297-4308.
- Liu D, Liang L, Regenstein JM, Zhou P. 2012. Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from fins, scales, skins, bones and swim bladders of bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*). *Food Chemistry*. 133: 1441-1448.
- Liu D, Wei G, Li T, Hua J, Lu J, Regenstein JM, Zhou P. 2015. Effects of alkaline pretreatment and acid extraction conditions on the acid soluble collagen from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin. *Food Chemistry*. 172: 836-843.
- Miazwir. 2012. Analisis aspek biologi reproduksi ikan tuna sirip kuning (*Thunnus albacares*) yang tertangkap di Samudera Hindia [Tesis]. Depok (ID): Universitas Indonesia.
- Moyle PB, Cech JJ. 2004. *Fishes: an Introduction to Ichthyology*. Edisi ke-5. San Francisco (US): Pearson Benjamin Cummings.
- Muyonga JH, Cole CGB, Duodu KG. 2004b. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). *Food Chemistry*. 86: 325-332.
- Nagai T, Izumi M, Ishii M. 2004. Preparation and partial characterization of fishscale collagen. *International Journal of Food Science and Technology*. 39: 239-244.
- Nalinanon S, Benjakul S, Kishimura H. 2010. Biochemical properties of pepsinogen and pepsin from the stomach of albacore tuna (*Thunnus alalunga*). *Food Chemistry*. 121: 49-55.
- Nalinanon S, Benjakul S, Visessanguan W, Kishimura H. 2007. Use of pepsin for collagen extraction from the skin of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). *Food Chemistry*. 104: 593-601.
- Nollet LML. 1996. *Handbook of Food Analysis: Physical Characterization and Nutrient Analysis*. London (GB): Dekker.
- Nur'aenah N. 2013. Ekstraksi dan karakterisasi kolagen dan nanopartikel kolagen dari kulit ikan pari (*Pastinachus solocirostris*) sebagai bahan baku cosmeceutical [Tesis]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Nurhayati, Tazwir, Murniyati. 2013. Ekstraksi dan karakterisasi kolagen larut asam dari kulit ikan nila. (*Oreochromis niloticus*). *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*. 8 (1): 85-92.
- Nurilmala M, Jacob A M, Dzaky R A. 2017. Karakteristik gelatin kulit ikan tuna sirip kuning. *JPHPI*. 20(2):339-350.
- Nurilmala M, Pertiwi RM, Nurhayati T, Fauzi S, Batubara I, Ochiai Y. 2019. Characterization of collagen and its hydrolysate from yellowfin tuna *Thunnus albacares* skin and their potencies as antioxidant and antiglycation agents. *Fisheries Science*. 1(1):1-9.
- Oktaviani RZI, Perdana F, Nasution AY. 2017. Perbandingan sifat gelatin yang berasal dari kulit ikan patin dan gelatin yang berasal dari kulit ikan komersil. *Journal of Pharmacy Science*. 1(4):1-8.
- Pasaribu E, Nurhayati T, Nurilmala M. 2018. Ekstraksi dan karakterisasi enzim pepsin dari lambung ikan tuna (*Thunnus albacares*). *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 21(3): 486-496.
- Peranginangin R, Murniyati, Nurhayati, Rahmad W. 2015. *Pengolahan kolagen dari kulit ikan nila*. Jakarta (ID): Penebar Swadaya. 8-11.
- Pertiwi RM. 2016. Ekstraksi dan karakterisasi kolagen larut papain dari kulit ikan tuna sirip kuning. [Skripsi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Saito H, Tetsushi T, Aoki H, Murabayashi S, Mitamura Y, Tanaka J, Tateishi T. 2007. pH-responsive swelling behavior of collagen

- gels prepared by novel crosslinkers based on naturally derived di- or tricarboxylic acids. *Acta Biomaterialia*. 3: 89-94.
- Sastrohamidjojo H. 2018. *Dasar-dasar spektroskopi*. Yogyakarta (ID): Penerbit Gadjah Mada University Press.
- Sayana KS, Sirajudheen TK. 2017. By-products from tuna processing wastes an economic approach to coastal waste management. *Proceedings of the International Seminar on Coastal Biodiversity Assessment*. 411-420.
- Schaumann T, Kraus D, Winter J, Wolf M, Deschner J, Jager A. 2013. Potential immune modularly role of glycine in oral gingival inflammation. *Clinical and Development Immunology*. 5(2): 1-9.
- Setyowati H, Setyani W. 2015. Potensi nanokolagen limbah sisik ikan sebagai cosmeceutical. *Jurnal Farmasi Sains Dan Komunitas*. 12(1):30-40.
- Shanmugam V, Ramasamy P, Subhapradha N, Sudharsan S, Seedeve P, Moovendhan M, Krishnamoorthy J, Shanmugam A, and Srinivasan A. 2012. Extraction, structural and physical characterization of type I collagen from the outer skin of *Sepiella inermis* (Orbigny, 1848). *African Journal of Biotechnology*. 11(78): 14326-14337.
- Shon J, Eo J-H, Hwang SJ, Eun J-B. 2011. Effect of processing conditions on functional properties of collagen powder from skate (*Raja kenoei*) skins. *Food Science and Biotechnology*. 20(1): 99-106.
- Silva MR, Celem LR, Silva SR, Costa APF. 2013. Anti aging cosmetics: Facts and controversies. *Clinics in Dermatology*. 31:750-758.
- Sivipriya KS, Kumar KK, Bhat AR, Kumar BD, John A, Lakshamanan P. 2015. Collagen: Animal Sources and Biomedical Application. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 5(03): 123-127.
- Singh P, Benjakul S, Maqsood S, Kishimura H. 2011. Isolation and characterisation of collagen extracted from the skin of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Food Chemistry*. 124(3): 97-105.
- [SNI] Standar Nasional Indonesia. 1992. *SNI 01-2891-1992. Cara uji makanan dan minuman*. Jakarta (ID): Badan Standar Nasional.
- Sun DW. 2006. *Thermal Food Processing: New Technologies and Quality Issues*. Boca Rason: CRC Press Taylor and Francis Group.
- Tabarestani S, Maghsoodlou Y, Motamedzadegan A, Mahoonak SAR, Rostamzad H. 2012. Study on some properties of acid-soluble collagens isolated from fish skin and bones of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). *International Food Research Journal*. 19(1): 251-257.
- Tazwir, Ayudiarti DL, Peranginangin R. 2007. Optimasi pembuatan gelatin dari tulang ikan kaci-kaci (*Plectorhynchus chaetodonoides* Lac.) menggunakan konsentrasi asam dan waktu ekstraksi. *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*. 2(1): 35-43.
- Triharyuni S, Prisantoso BI. 2012. Komposisi jenis dan sebaran ukuran tuna hasil tangkapan longline diperairan Samudera Hindia Selatan Jawa. *Jurnal Saintek Perikanan*. 8(1): 52-58.
- Wong DWS. 1989. *Mechanism and Theory in Food Chemistry*. New York: Van Nostrand Reinhold
- Zhao L, Budge SM, Ghaly AE, Brooks MS, Dave D. 2011. Extraction, purification and Characterization of fish pepsin: A Critical Review. *Food Process Technology*. 2(6): 1-14.