

KARAKTERISTIK FISIKOKIMIA *PAPAIN SOLUBLE COLLAGEN* DARI GELEMBUNG RENANG IKAN TUNA (*Thunnus sp.*)

Hari Cahyono^{1*}, Wini Trilaksani¹, Uju^{1,2}

¹Departemen Teknologi Hasil Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, IPB University

² Surfactant and Bioenergy Research Center, IPB University

Diterima: 31 Oktober 2021/Disetujui: 4 Februari 2022

*Korespondensi: haricahyono@apps.ipb.ac.id

Cara sitasi: Cahyono H, Trilaksani W, Uju. 2022. Karakteristik fisikokimia *papain soluble collagen* dari gelembung renang ikan tuna (*Thunnus sp.*). *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 25(1): 1-17.

Abstrak

Kolagen merupakan protein jaringan ikat yang tersusun oleh asam amino glisina, prolina, alanina dan hidroksiprolina, yang terdapat pada jaringan kulit, tulang, sisik, dan gelembung renang ikan. Gelembung renang ikan sebagai hasil samping industri perikanan potensial dikonversi menjadi kolagen halal. Penelitian ini bertujuan mengevaluasi efektivitas proses praekstraksi kombinasi NaOH dan ultrasonikasi serta penggunaan enzim papain pada proses ekstraksi terhadap karakteristik fisikokimia kolagen gelembung renang ikan tuna. Metode penelitian ini adalah praekstraksi kombinasi NaOH dan ultrasonikasi 150 menit serta perendaman selama 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, dan 24 jam, ekstraksi menggunakan enzim papain dengan konsentrasi 0, 3.500, dan 5.000 U/g dan waktu ekstraksi selama 36 dan 48 jam. Hasil penelitian menunjukkan bahwa proses praekstraksi menggunakan ultrasonikasi 150 menit dengan perendaman selama 22 jam merupakan waktu terbaik dalam mengeliminasi protein non kolagen, dan ekstraksi menggunakan enzim papain konsentrasi 5.000 U/g dan perendaman 36 jam merupakan perlakuan terpilih terhadap derajat pengembangan kolagen. Rendemen kolagen yang diperoleh sebesar 7,01±0,4%, asam amino yang mendominasi ialah glisina, arginina dan prolina, kolagen gelembung renang ikan tuna memiliki pita protein rantai α_1 sebesar 117 kDa, rantai α_2 sebesar 107 kDa dan rantai β sebesar 244 kDa serta nilai zeta potensial sebesar 0,496 mV.

Kata kunci: asam amino, bobot molekul, derajat pengembangan, zeta potensial

Physicochemical Characteristics of Papain Soluble Collagen from Tuna (*Thunnus sp.*) Swim Bladder

Abstract

Collagen is a connective tissue protein composed of the amino acids glycine, proline, alanine and hydroxyproline, which are found in the skin, bones, scales and swim bladder tissue of fish. Fish swim bladder as a by-product of the fishing industry have the potential to be converted into halal collagen. This study aims to evaluate the effectiveness of the pre-extraction process of the combination of NaOH and ultrasonication and the use of papain enzyme in the extraction process on the physicochemical characteristics of tuna swim bladder collagen. The research method was a combination of pre-extraction of NaOH and 150 minutes of ultrasonication and immersion for 2; 4; 6; 8; 10; 12; 14; 16; 18; 20; 22 and 24 hours, extraction using the papain enzyme with a concentration of 0; 3,500 and 5,000 U/g and extraction time of 36 and 48 hours. The results showed that the pre-extraction process using 150 minutes of ultrasonication with soaking for 22 hours was the best time to eliminate non-collagen proteins, and extraction using papain enzyme with a concentration of 5,000 U/g and soaking for 36 hours was the preferred treatment for the degree of collagen development. The yield of collagen obtained was 7.01±0.4%, the dominant amino acids were glycine, arginine and proline, tuna swim bladder collagen had a protein band of α_1 chain of 117 kDa, α_2 chain of 107 kDa and β chain of 244 kDa and zeta potential value of 0.496 mV.

Keyword: amino acids, molecular weight, swelling degree, zeta potential

PENDAHULUAN

Kolagen adalah protein struktural utama dari berbagai jaringan ikat yang ada pada hewan yang banyak ditemukan pada jaringan fibrosa misalnya tendon dan ligamen dan juga melimpah di kornea, tulang rawan, tulang, pembuluh darah, usus, dan cakram intervertebralis (Sibilla *et al.* 2015). Kolagen merupakan protein jaringan ikat yang memiliki bentuk berserat yang menyusun sekitar 30% dari tubuh vertebrata dan menjadi protein dengan jumlah paling banyak pada kerajaan hewan dan membentuk elemen struktural utama dari semua jaringan ikat serta di jaringan interstisial hampir semua organ parenkim. Kolagen berkontribusi pada stabilitas jaringan dan organ serta mempertahankan integritas struktural (Ashraf *et al.* 2017).

Pada era ini, sumber utama kolagen berasal dari sapi dan babi yang dalam penggunaannya menimbulkan kekhawatiran akan faktor keamanannya karena menjadi sumber penyakit misalnya penyakit sapi gila/*Bovinium Spongiform Encephalopathy* (BSE) dan penyakit mulut dan kuku/*Foot and Mouth Disease* (FMD) serta masalah kehalalannya (Jeevithan *et al.* 2014; Liang *et al.* 2014). Mengatasi permasalahan ini, kolagen dari hasil laut terutama limbah samping industri dapat menjadi sumber alternatif sekaligus menambah nilai ekonomi sektor pemrosesan ikan serta mendukung kebutuhan industri (Huang *et al.* 2016; Ahmed *et al.* 2019).

Ikan tuna (*Thunnus* sp.) merupakan salah satu komoditas perikanan tangkap Indonesia yang jumlah produksi tangkapnya terus meningkat. Produksi ikan tuna di Indonesia pada tahun 2017 mencapai 293.233 ton, angka ini meningkat dari produksi tahun sebelumnya sebesar 271.856 ton. Pada tahun 2018 produksi tuna nasional mencapai angka 409.024 ton. Data sementara produksi tahun 2019 mencapai 319.325 ton dan tahun 2020 mencapai 69.650 ton (KKP 2021). Ikan tuna merupakan ikan perenang cepat yang hidup bergerombol dan tersebar luas pada perairan tropis dan subtropis. Kecepatan renang ikan tuna dapat mencapai 50 km/jam. Kemampuan renang yang dimiliki ikan tuna merupakan salah satu faktor yang menjadikan

ikan tuna tersebar cukup luas. Beberapa jenis ikan tuna yang tertangkap di perairan Indonesia adalah madidihang/*yellowfin tuna* (*Thunnus albacares*), tuna mata besar/*bigeye tuna* (*Thunnus obesus*), albakora/*albacore* (*Thunnus alalunga*) dan tuna sirip biru/*bluefin tuna* (*Thunnus maccoyi*) (Triharyuni dan Prisantoso 2012).

Gelembung renang merupakan bagian dari hasil samping ikan yang digolongkan ke dalam organ internal ikan dan sangat potensial untuk dimanfaatkan menjadi produk sehingga dapat meningkatkan nilai lebih. Proporsi gelembung renang ikan tuna rata-rata 0,53% (Idrus *et al.* 2018). Berdasarkan beberapa penelitian yang sudah dilakukan diketahui bahwa gelembung renang ikan dapat diproses menjadi kolagen.

Rangkaian proses isolasi kolagen diawali dengan proses praekstraksi menggunakan asam maupun basa yang bervariasi sesuai dengan asal bahan baku yang digunakan, serta bertujuan mengeliminasi kandungan protein nonkolagen (Schmidt *et al.* 2016). Penggunaan pelarut basa misalnya NaOH dalam proses praekstraksi lebih baik dan efektif dalam mengeliminasi protein nonkolagen serta lebih aman karena hanya menyebabkan kehilangan protein kolagen dalam jumlah yang sedikit (Liu *et al.* 2015). Teknologi ultrasonik dapat digunakan untuk mengintensifkan proses tersebut agar mendapatkan hasil lebih optimal (Astashev dan Babitsky 2007). Saat ini, iradiasi ultrasonik banyak digunakan untuk meningkatkan pemindahan massa dalam proses basah yang penting dalam pencampuran, ekstraksi, dan pengeringan (Zeng *et al.* 2012).

Sampai saat ini metode ekstraksi kolagen yang umum digunakan adalah metode ekstraksi asam karena mudah dilakukan. Selain itu dapat pula dilakukan proses ekstraksi menggunakan enzim. Enzim yang umum digunakan untuk mengisolasi kolagen adalah enzim pepsin, namun penggunaan enzim pepsin menimbulkan kekhawatiran karena bersumber dari babi sehingga perlu disubstitusikan ke enzim jenis lain misalnya enzim papain yang bersumber dari buah dan getah pepaya (Wong 2018). Nurhayati *et al.* (2018) melaporkan bahwa

kolagen yang diekstraksi dari kulit ikan ekor kuning (*Caesio cuning*) menggunakan enzim papain menghasilkan rendemen yang lebih tinggi daripada yang hanya diekstraksi menggunakan asam.

Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi pengaruh NaOH dan ultrasonikasi dalam melarutkan protein nonkolagen dan konsentrasi enzim papain dan waktu ekstraksi terhadap karakteristik fisikokimia kolagen yang dihasilkan.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Bahan baku gelembung renang ikan tuna diperoleh dari PT Pahala Bahari Nusantara, Cikarang, Jawa Barat. Bahan kimia yang digunakan yaitu enzim papain (EC 3.4.22.2) komersial dengan aktivitas 30.000 USP units/mg (Himedia, India), NaOH (Merck, Jerman), CH₃COOH (Merck, Jerman), NaCl (Merck, Jerman), *Bovine Serum Albumin* (BSA), *Coomasie Brilliant Blue* (CBB), akuades dan bahan lainnya. Alat yang digunakan yaitu *ultrasonic cleaner bath* 40 KHz; 100 W (DSA100-SK2 4.0 L, China), timbangan analitik (OHAUS A224), mikropipet, kertas whatman, UPLC-MS, spektrofotometer UV-Vis (DR 5000, Dusseldorf, Germany), alat sentrifugasi (Sorvall Lynx 6000, Thermo Scientific, Jerman), kantung dialisis (Carolina, AS), pengering beku (Alpha 1-2 LD plus, Christ, Jerman), penangas air (BT25 Yamato, Jepang), elektroforesis (PEQ Lab, Jerman), *zeta potential analyzer* (Malvern, Inggris).

Metode

Penelitian ini dilakukan dalam empat tahap yaitu preparasi dan karakterisasi gelembung renang ikan tuna berupa analisis proksimat dan asam amino; proses praekstraksi menggunakan NaOH dan ultrasonikasi; ekstraksi kolagen menggunakan enzim papain dan karakterisasi kolagen meliputi analisis derajat pengembangan, analisis rendemen, komposisi asam amino, bobot molekul, zeta potensial.

Preparasi dan karakterisasi gelembung renang ikan tuna

Gelembung renang yang diperoleh dari hasil samping industri pengolahan ikan dicuci menggunakan air bersih dan dipotong menjadi ukuran $\pm 0,5 \times 0,5$ cm² dengan tujuan untuk memperluas permukaan sehingga mempermudah proses penghilangan protein nonkolagen dan ekstraksi. Gelembung renang dianalisis komposisi proksimat dan asam amino.

Praekstraksi

Proses praekstraksi mengacu pada metode Zeng *et al.* (2012) dengan modifikasi penggunaan ultrasonik. Proses praekstraksi dilakukan untuk mengeliminasi protein nonkolagen dan untuk mendapatkan hasil lebih maksimal dalam proses. Protein nonkolagen, pigmen, dan lemak dihilangkan dari gelembung renang dengan cara direndam dalam NaOH dengan konsentrasi 0,1 M dengan rasio bahan dan larutan adalah 1:10 (b/v) pada suhu 4°C selama 24 jam dengan regulasi larutan NaOH setiap 2 jam. Ultrasonikasi pada proses praekstraksi dilakukan selama 150 menit pada suhu 4°C. Larutan NaOH yang digunakan untuk perendaman gelembung renang diuji kandungan protein nonkolagenya menggunakan metode Bradford.

Ekstraksi kolagen

Ekstraksi kolagen mengacu pada metode Jamilah *et al.* (2013). Gelembung renang hasil praekstraksi dicuci hingga mencapai pH netral. Gelembung renang direndam dalam asam asetat konsentrasi 0,5 M dengan rasio 1:20 (b/v) dan ditambahkan enzim papain dengan konsentrasi 0; 3.500; 5.000 U/g sampel pada suhu 4°C selama 36 dan 48 jam. Proses penyaringan dilakukan menggunakan kain penyaring. Filtrat yang dihasilkan lalu dipresipitasi dengan NaCl hingga mencapai konsentrasi akhir 2,6 M selama 12 jam. Presipitat dipisahkan dengan cara sentrifugasi 10.000 g pada suhu 4°C selama 30 menit. Hasil sentrifugasi berupa pelet. Pelet dilarutkan ke dalam 0,5 M asam asetat dengan rasio 1:1

(b/v) dan didialisis menggunakan kantong dialisis 12 kDa terhadap 0,1 M asam asetat dan akuades masing-masing selama 24 jam dengan rasio 1:10 (b/v) sampai diperoleh pH netral, kemudian dilakukan pengeringan beku selama 72 jam untuk memperoleh kolagen kering.

Karakterisasi fisikokimia kolagen

Karakterisasi kolagen yang dilakukan meliputi analisis derajat pengembangan, rendemen, analisis komposisi asam amino, bobot molekul, dan zeta potensial.

Analisis proksimat (SNI 01-2891-1992)

Analisis proksimat dilakukan untuk mengetahui komposisi kimia yang terdapat pada suatu bahan. Analisis yang dilakukan antara lain analisis kadar air, kadar protein, kadar lemak dan kadar abu.

Analisis komposisi asam amino (Nollet 1996)

Komposisi asam amino dianalisis menggunakan instrument *ultra performance liquid chromatography* (UPLC). Perangkat UPLC dibilas dengan eluen dan *syringe* dibilas dengan akuades. Prosedur analisis ini terdiri atas dua tahapan yaitu pembuatan larutan sampel dan pembuatan larutan standar. Kadar asam amino dihitung berdasarkan rumus berikut:

$$\text{Kadar asam amino} = \frac{\text{Luas area sampel}}{\text{Luas area standar}} \times \frac{C \times B \times M \times F \times 103}{\text{Berat sampel (g)}}$$

Keterangan:

C = Konsentrasi standar asam amino

FP = Faktor pengenceran

BM = Bobot molekul asam amino

Pengukuran kadar protein terlarut (Bradford 1976)

Konsentrasi protein ditentukan dengan mencampurkan sebanyak 500 mg *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) dan 25 mL etanol lalu ditambahkan 50 mL asam fosfat 85%. Kemudian ditambahkan akuades hingga diperoleh volume 500 mL dan disaring menggunakan kertas saring Whatman No. 1 sebelum digunakan. Sebanyak 0,1 mL sampel ditambah 5 mL larutan Bradford

kemudian dihomogenkan menggunakan vortex. Nilai absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-2500 pada panjang gelombang 595 nm. Absorbansi standar BSA ditambah larutan Bradford diukur dengan metode yang sama.

Penentuan derajat pengembangan kolagen (Tronci *et al.* 2013)

Kolagen kering sebanyak 0,1 g dalam 5 mL akuades diinkubasi selama 10 menit, kemudian ditiriskan dan timbang beratnya. *Swelling ratio* (SR) atau nisbah pengembang berbasis berat sampel yang dihitung berdasarkan persamaan berikut:

$$SR (\%) = \frac{A-B}{B} \times 100\%$$

Keterangan:

A= Berat sampel setelah mengembang

B= Berat sampel kering

Rendemen

Rendemen kolagen didapat dari rasio antara berat kolagen kering dengan berat gelembung renang ikan sebelum dilakukan praperlakuan. Rendemen didapat dengan perhitungan sebagai berikut:

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

Pengukuran bobot molekul (Laemmli 1970)

Berat molekul kolagen ditentukan menggunakan instrumen *Sodium Dodecyl Sulphate Poliacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE). Gel yang dipergunakan untuk elektroforesis terdiri atas gel penahan atau stacking gel dengan konsentrasi 3% dan gel pemisah atau *separating gel* dengan konsentrasi 10%. Sebelum proses elektroforesis, sampel protein didenaturasi menggunakan SDS dan merkaptoetanol yang disertai dengan proses pemanasan. Elektroforesis dilakukan menggunakan arus listrik 35-50 mA dan tegangan 170 V selama 1 jam, setelah selesai gel diwarnai dengan menggunakan larutan pewarnaan (*staining*) yang mengandung *coomassie brilliant blue* kemudian dibilas dengan larutan *destaining* yang mengandung asam asetat jenuh selama semalaman.

Analisis zeta potensial (Tan dan Chang 2018)

Prinsip analisis zeta potensial adalah mengukur kecepatan partikel bermuatan yang bergerak menuju elektroda melintasi larutan sampel dengan adanya medan listrik eksternal. Kolagen dilarutkan dalam akuades non ion pada konsentrasi 1 mg/mL. Selanjutnya sebanyak 1 ml larutan kolagen dipindahkan ke sel kapiler dan pH larutan kolagen disesuaikan menjadi 2 hingga 6 menggunakan 1 M asam nitrat atau 1 M KOH.

Analisis data

Analisis data yang digunakan pada tahap karakterisasi gelembung renang ikan tuna meliputi uji komposisi proksimat dan asam amino adalah analisis secara deskriptif dengan hasil berupa *table* dan grafik. Rancangan percobaan yang digunakan pada proses ekstraksi menggunakan enzim papain dengan konsentrasi (0, 3.500, dan 5.000 U/g) dan waktu ekstraksi (36 dan 48 jam) menggunakan rancangan acak lengkap faktorial. Data hasil penelitian dianalisis dengan analisis ragam menggunakan perangkat SPSS 22.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Komposisi Proksimat Gelembung Renang Ikan Tuna

Pengujian komposisi proksimat pada gelembung renang ikan tuna bertujuan untuk mengetahui kandungan gizi secara kasar pada bahan sehingga dapat diketahui kelayakan mutu bahan yang akan di proses menjadi kolagen. Komposisi proksimat gelembung renang ikan tuna dapat dilihat pada *Table 1*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar air memiliki nilai yang lebih tinggi

dibandingkan komposisi proksimat lainnya. Kadar air menunjukkan hasil yang lebih rendah dibandingkan hasil penelitian Idrus *et al.* (2018) yang menggunakan bahan baku gelembung renang ikan sirip kuning. Kadar air pada bahan tersusun atas air bebas dan air terikat secara kimia, kemudian kadar air yang terukur merupakan air bebas dalam bahan baku. Kadar air juga berpengaruh pada kesegaran dan daya tahan suatu bahan (Gadi *et al.* 2017). Menurut Wulandari *et al.* (2015) proses penyimpanan dalam kondisi beku juga dapat memengaruhi kadar air, di mana air terpenetrasi kedalam struktur jaringan bahan dan dapat menyebabkan kerusakan terhadap kadar protein bahan.

Gelembung renang berfungsi untuk mengontrol daya apung, ruang sekresi gas, ruang resorpsi gas, penghasil suara dan aktivitas hidrostatis (Stewart dan Hughes 2013; Sievers *et al.* 2021). Gelembung renang dilaporkan mengandung kadar protein kasar yang tinggi (Gonzales-Felix *et al.* 2021). Protein merupakan fraksi biopolimer tertinggi dalam gelembung renang, mengindikasikan bahwa gelembung renang ikan tuna memiliki potensi untuk diolah dan dapat menjadi sumber alternatif kolagen. Kadar protein menunjukkan hasil yang lebih tinggi dibandingkan hasil penelitian Idrus *et al.* (2018) yang juga menggunakan bahan gelembung renang ikan tuna sirip kuning. Menurut Mustafida *et al.* (2019) bahwa kadar protein dapat bervariasi sesuai sumber, sumber makanan, spesies, dan bahan baku yang digunakan.

Analisis kadar abu merupakan analisis yang bertujuan untuk mengetahui komposisi mineral pada suatu bahan. Hasil analisis kadar

Table 1 Chemical composition of the tuna swim bladder and several other species

Parameters	Percentage (% wb)				
	<i>Thunnus</i> sp. ¹	<i>Thunnus albacares</i> ²	<i>Muraenesox talabon</i> ³	<i>Pangasius</i> sp. ⁴	<i>Epinephelus fuscoguttatus</i> ⁵
Protein (%)	22.69±0.01	20.27	24.74±0.75	21.47±0.47	25.88±0.00
Ash (%)	0.44±0.01	1.24	0.27±0.03	0.51±0.05	0.15±0.01
Lipid (%)	0.90±0.01	3.17	0.50±0.05	0.42±0.02	1.29±0.00
Moisture (%)	74.79±0.02	76.24	73.88±0.22	74.64±0.91	71.31±0.84

Note: ¹Research data, ²Idrus *et al.* (2018), ³Kartika *et al.* (2016), ⁴Simamora *et al.* (2019), ⁵Trilaksani *et al.* (2020).

abu pada penelitian ini lebih rendah dibandingkan kadar abu gelembung renang ikan tuna sirip kuning (Idrus *et al.* 2018), namun masih lebih tinggi dibandingkan kadar abu gelembung renang ikan cunang (Kartika *et al.* 2016). Perbedaan nilai kadar abu dapat disebabkan oleh habitat, jenis spesies dan banyaknya mineral yang diserap oleh organisme. Menurut Upasen *et al.* (2019) kadar abu berupa kalsium, protein non kolagen, dan pigmen.

Kadar lemak gelembung renang ikan tuna menunjukkan hasil yang lebih rendah dibandingkan gelembung renang ikan tuna sirip kuning dan gelembung renang ikan kerapu (Idrus *et al.* 2018; Trilaksani *et al.* 2020) namun lebih tinggi dibandingkan gelembung renang ikan cunang dan gelembung renang ikan patin (Kartika *et al.* 2016; Simamora *et al.* 2019). Perbedaan kadar lemak dapat disebabkan oleh banyak faktor seperti musim, spesies, dan perbedaan kondisi geografis. Variasi usia dan kematangan pada spesies yang sama juga dapat berkontribusi pada perbedaan yang signifikan dalam kadar lemak total (Nurnadia *et al.* 2011).

Komposisi Asam Amino Gelembung Renang Ikan Tuna

Asam amino adalah blok pembangun dasar protein, dan berfungsi sebagai tumpuan nitrogen untuk senyawa misalnya neurotransmitter dan hormon. Komposisi asam amino gelembung renang ikan tuna

dapat dilihat pada *Figure 1*. Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa gelembung renang ikan tuna mengandung glisina sebesar 15,44 mg/g dan prolina sebesar 8,42 mg/g serta alanina 13,1 mg/g. sedangkan kandungan asam amino hidroksiprolina sebesar 0,042 mg/g. Asam amino berkontribusi pada stabilitas struktur heliks kolagen dan merupakan salah satu sifat utama yang menentukan aplikasi potensial kolagen (Zhao *et al.* 2018). Kadar hidroksiprolina dalam penelitian ini masih lebih rendah dari hasil penelitian Kaewdang *et al.* (2014) yang juga menggunakan bahan gelembung renang ikan tuna yaitu 1,46 mg/g bahan. Perbedaan dalam kandungan asam amino secara total dan hidroksiprolina berhubungan dengan jenis ikan dan berkorelasi dengan suhu habitat jenis ikan (Chen *et al.* 2019). Kandungan hidroksiprolina yang berbeda antar spesies berkaitan dengan spesies, lingkungan, dan suhu tubuh ikan. Hidroksiprolina berperan dalam menstabilkan struktur triple heliks dengan membentuk ikatan hidrogen antar rantai melalui gugus hidroksil (Zhang *et al.* 2012; Sinthusamran *et al.* 2013).

Hickman *et al.* (2000) menyatakan bahwa setiap nilai yang terukur mungkin merupakan hasil dari rendahnya nilai inheren dari kandungan hidroksiprolina ikan atau adanya protein non kolagen. Variasi kandungan hidroksiprolina di antara spesies ikan terjadi karena perbedaan suhu tubuh dan variasi musim (Jeevithan *et al.* 2014b). Hidroksiprolina

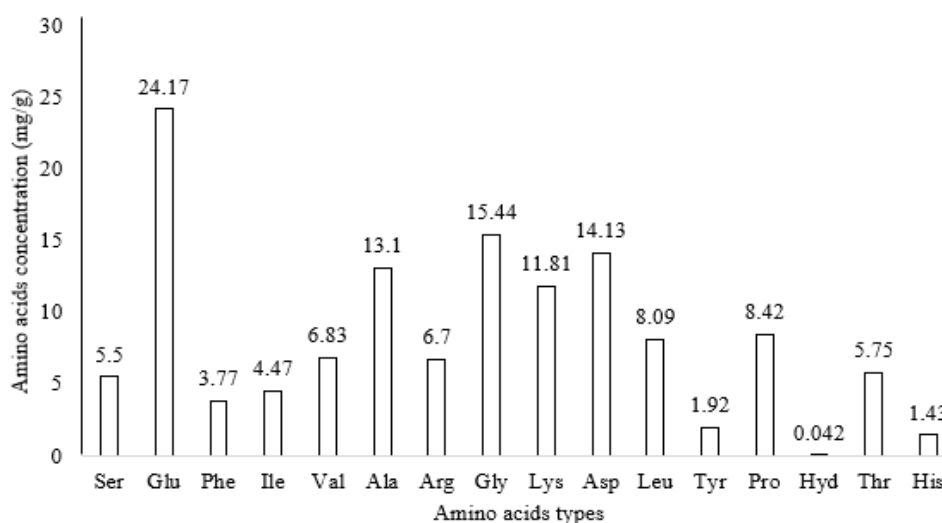


Figure 1 Amino acids compositions of tuna swim bladder

berperan dalam menstabilkan struktur triple heliks dengan pembentukan ikatan hidrogen antar rantai melalui gugus hidroksil (Kittiphattanabawon *et al.* 2005). Kandungan hidroksiprolina pada ikan yang hidup pada lingkungan dingin lebih rendah dibandingkan ikan yang hidup pada lingkungan hangat, karena hidroksiprolina terlibat dalam ikatan hidrogen antar rantai yang menstabilkan struktur triple heliks kolagen (Tabarestani *et al.* 2012).

Konsentrasi Protein Terlarut NaOH dan Ultrasonikasi

Proses isolasi kolagen dari gelembung renang ikan tuna diawali dengan proses praekstraksi dengan tujuan mengeliminasi kandungan protein non kolagen. Proses penggantian larutan NaOH setiap 2 jam memiliki tujuan untuk memaksimalkan proses praekstraksi. Konsentrasi protein terlarut gelembung renang ikan tuna dapat dilihat pada *Figure 2*. Konsentrasi protein non kolagen terlarut terus mengalami penurunan seiring dengan fungsi waktu perendaman. Hal tersebut menunjukkan bahwa protein non kolagen dapat dilarutkan selama proses praekstraksi. Setelah 22 jam waktu praekstraksi tidak terjadi lagi penurunan konsentrasi protein non kolagen.

Durasi praekstraksi dapat berbeda-beda sesuai dengan bahan baku yang digunakan seperti bahan gelembung renang ikan karper rumput (*Ctenopharyngodon idella*) selama 36 jam (Liu *et al.* 2015), gelembung renang ikan giant croaker (*Nibea japonica*) selama

24 jam (Chen *et al.* 2019), gelembung renang ikan karper kepala besar (*Hypophthalmichthys nobilis*) dan ikan karper rumput (*Ctenopharyngodon idella*) selama 36 jam (Hu *et al.* 2016). Durasi waktu praekstraksi yang lebih lama akan meningkatkan eliminasi kandungan protein non kolagen hingga mencapai batas waktu optimal. Berdasarkan hasil tersebut, penggunaan ultrasonikasi dapat memaksimalkan proses penghilangan protein non kolagen dalam gelembung renang.

Petcharat *et al.* (2020) menyatakan bahwa waktu ultrasonikasi yang lebih lama menghasilkan lebih banyak energi untuk melonggarkan matriks bahan sehingga memungkinkan penetrasi pelarut yang lebih besar ke dalam matriks bahan dan melepaskan komponen target. Proses praekstraksi pada penelitian ini dilakukan pada suhu 4°C dengan cara menambahkan es ke dalam tangki ultrasonik sehingga suhu proses praekstraksi dapat terjaga dan tetap stabil. Menurut Liu *et al.* (2015) penggunaan larutan NaOH dengan konsentrasi 0,05 dan 0,1 M dapat mengeliminasi kandungan protein non kolagen tanpa memberikan dampak kehilangan protein kolagen, sedangkan bila menggunakan konsentrasi NaOH yang lebih tinggi dapat berdampak pada hilangnya protein kolagen dalam jumlah yang cukup tinggi.

Gelombang ultrasonik menyebabkan pembentukan gelembung mikro dalam larutan. Saat gelembung mikro pecah dan menyebar yang kemudian membentuk gradien geser tinggi dan menyebabkan peningkatan

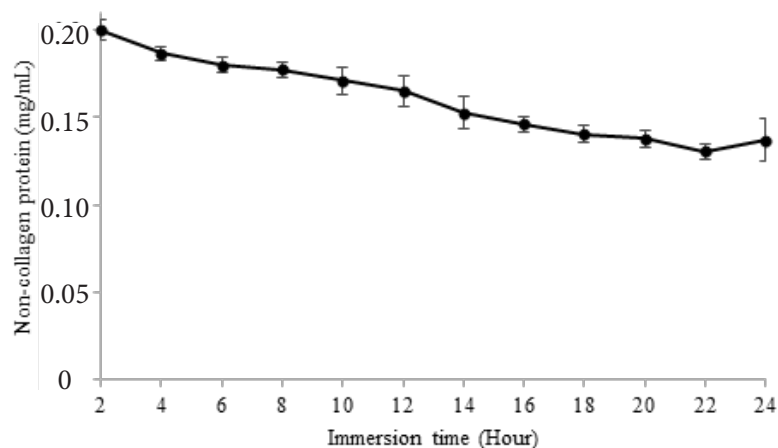


Figure 2 Concentration of dissolved protein from the immersion of tuna swim bladder

gangguan dinding sel dan fenomena ini kemungkinan besar memungkinkan pelarut menembus ke dalam bahan dan melepaskan komponen yang menjadi tujuan proses (Gulzar dan Benjakul 2018).

Ekstrak Kolagen Gelembung Renang Ikan Tuna

Enzim papain (EC 3.4.22.2) tergolong ke dalam jenis enzim proteolitik yang dapat ditemukan dalam lateks dan buah pepaya (*Carica papaya*). Papain merupakan proteinase sulfhidril yang terdiri dari rantai polipeptida tunggal 23 kDa dengan 212 residu asam amino (Wong 2018). Bugg (2004) menjelaskan bahwa enzim papain memiliki basis sisi aktif yang mengandung gugus sisteina dan histidina yang berfungsi menyerang ikatan amida. Enzim papain menyerang karbon karbonil rantai peptida dan melepaskan bagian N terminal, karena proses ini terjadi diseluruh rantai peptida protein maka menyebabkan protein menjadi pecah. Mekanisme ini melibatkan Sisteina-25 dan Histidina-159 (Amri dan Mamboya 2012). Proses ekstraksi ini merupakan kombinasi proses asam dan enzimatis, di mana proses diawali dengan melarutkan bahan dalam larutan asam asetat dengan tujuan membuka struktur bahan. Li et al. (2013) menjelaskan bahwa pH antara 1 hingga 4 merupakan pH maksimum ekstraksi kolagen menggunakan enzim. Pada penelitian Ong et al. (2021) diketahui bahwa ekstraksi kolagen menggunakan enzim

memberikan hasil yang lebih tinggi dalam kondisi asam pada kisaran pH dari 1 hingga 5 dan menunjukkan hasil maksimum pada pH 4. Menurut Song et al. (2014) yang melakukan ekstraksi kolagen dari paru-paru kura-kura cangkang lunak (*Pelodiscus sinensis*) bahwa pH 3 merupakan pH maksimum ekstraksi menggunakan enzim papain. Penentuan perlakuan terpilih dari kombinasi perlakuan konsentrasi enzim papain dan waktu ekstraksi berdasarkan parameter derajat pengembangan kolagen kering. Hasil pengujian derajat pengembangan kolagen kering dapat dilihat pada Figure 3.

Hasil uji derajat pengembangan menunjukkan bahwa perlakuan konsentrasi enzim 5.000 U/g menghasilkan derajat pengembangan kolagen tertinggi dibandingkan perlakuan lainnya. Kombinasi perlakuan perbedaan konsentrasi enzim dan waktu ekstraksi tidak berbeda nyata ($p>0,05$), oleh karena itu perlakuan konsentrasi enzim 5.000 U/g dengan waktu ekstraksi 36 jam dipilih sebagai perlakuan terbaik. Waktu ekstraksi 36 jam dengan konsentrasi enzim 5.000 U/g merupakan waktu yang lebih singkat dan efisien serta optimal dalam menghasilkan derajat pengembangan kolagen yang setara dengan waktu ekstraksi 48 jam. Kemampuan mengembang kolagen kering yang tinggi dapat disebabkan karena adanya interaksi ikatan hidrogen yang lebih banyak sebagai akibat dari interaksi kolagen dan air (Ng et al. 2020). Peningkatan pembengkakan kolagen

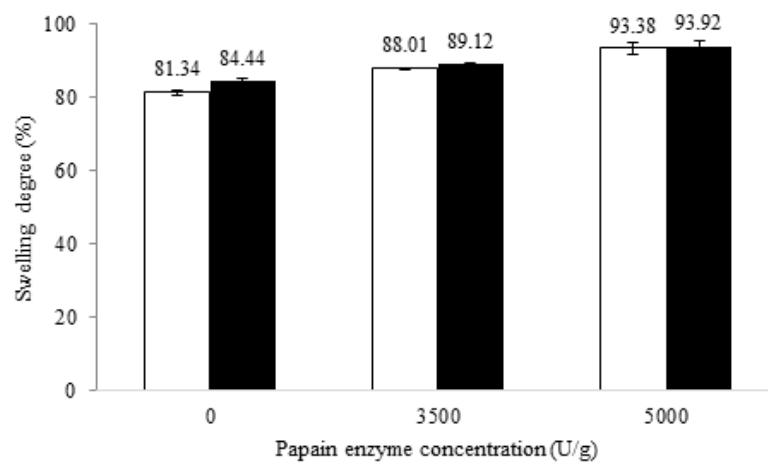


Figure 3 Swelling degree of tuna swim bladder collagen with a combination of the papain enzyme concentration and soaking time. Soaking time for 36 hours (□) and soaking for 48 hours (■).

dapat disebabkan oleh rusaknya jaringan retikuler dan jaringan elastin dengan cara memutus interaksi antarmolekul dan ikatan hidrogen yang berdampak pada berkurangnya kohesi molekul protein yang terdapat pada kolagen. Hasil dari interaksi tersebut ditunjukkan dengan adanya peningkatan berat pada kolagen setelah direndam dengan jangka waktu tertentu. Tingginya derajat pengembangan kolagen juga mengindikasikan semakin banyak ruang dalam fibril kolagen yang memungkinkan penyerapan larutan (Suparno dan Prasetyo 2019).

Kemampuan menyerap cairan yang tinggi mengacu pada peningkatan daya basah perancah, semakin banyak cairan yang dapat diserap perancah, maka semakin baik dan menggambarkan bahwa struktur perancah cukup berpori serta adanya retensi air dari serat kolagen (Haaparanta *et al.* 2008; Cheng *et al.* 2017). Perbedaan kemampuan mengembang kolagen juga dapat disebabkan perbedaan ukuran, bentuk, keseimbangan hidrofilik-hidrofobik asam amino yang terdapat dalam molekul protein dan faktor fisikokimia misalnya suhu, derajat keasaman, dan kekuatan ion (Kim dan Park 2004). Kapasitas pengikatan air tergantung pada jumlah residu hidrofilik yang terdapat dalam kolagen (Pan *et al.* 2018). Kemampuan menyerap air yang tinggi pada kolagen gelembung renang ikan tuna berkaitan dengan jumlah komponen asam amino polar yang lebih tinggi pada kolagen yang memiliki kemampuan membentuk ikatan hidrogen dengan air (Hou *et al.* 2012).

Rendemen

Pengukuran nilai rendemen bertujuan untuk mengetahui efektivitas transformasi suatu bahan untuk diubah menjadi produk. Rendemen kolagen dapat ditentukan dengan perhitungan dari perbandingan berat kering kolagen dengan berat basah awal gelembung renang. Rendemen kolagen gelembung renang ikan tuna yang diperoleh sebesar $7,01 \pm 0,4\%$. Hasil rendemen pada penelitian masih lebih tinggi dibandingkan hasil penelitian Hadinoto *et al.* (2019) yakni sebesar 1,15%. Rendemen kolagen gelembung renang ikan tuna yang diisolasi menggunakan

enzim menghasilkan nilai yang lebih tinggi dibandingkan kolagen larut asam dari gelembung renang ikan tuna madidihang.

Perbedaan nilai rendemen dapat dipengaruhi oleh kadar protein pada bahan, kondisi saat proses praekstraksi dan metode ekstraksi yang berbeda (Astiana *et al.* 2016). Prastyo *et al.* (2020) menyatakan bahwa rendemen dapat dipengaruhi oleh adanya proses polikondensasi -CHO pada terminal peptida atau antarmolekul ikatan silang pada kolagen yang menyebabkan berkurangnya kelarutan kolagen pada saat kondisi asam.

Perbedaan nilai rendemen juga dapat dipengaruhi oleh berbagai ikatan silang fibril kolagen dalam bahan baku. Kaewdang *et al.* (2014) menyatakan bahwa gelembung renang ikan *T. albacares* memiliki proporsi ikatan silang yang tinggi sehingga menyebabkan ekstraksi atau pelarutan kolagen yang lebih rendah sehingga penggunaan enzim dapat membantu pembelahan ikatan silang tersebut. Penggunaan enzim papain dalam proses ekstraksi juga berperan dalam meningkatkan rendemen kolagen. Penggunaan enzim papain akan memutus rantai polipeptida pada daerah tertentu tanpa merusak integritas struktur triple heliks kolagen sehingga dapat meningkatkan efisiensi proses ekstraksi dan persentase nilai rendemen.

Asam Amino Kolagen Gelembung Renang Ikan Tuna

Asam amino berkontribusi pada stabilitas struktur heliks kolagen dan integritas struktural serta merupakan salah satu sifat utama yang menentukan aplikasi potensialnya (Zhao *et al.* 2018).

Asam amino yang paling dominan dalam kolagen gelembung renang ikan tuna adalah glisina, arginina, dan prolina. Glisina adalah asam amino yang paling dominan pada kolagen, seluruh tipe kolagen ditandai dengan adanya pengulangan tripeptida (Gly-X-Y), Gly adalah glisina, X adalah prolina dan Y adalah hidroksiprolina yang berperan dalam pembentukan struktur triple heliks (Muyonga *et al.* 2004). Hasil penelitian ini sesuai dengan hasil penelitian Kaewdang *et al.* (2014) yang mengisolasi

kolagen dari gelembung renang ikan tuna madidihang dengan komposisi asam amino yang paling dominan yakni glisina. Glisina adalah asam amino kunci dalam mempertahankan struktur α -heliks molekul kolagen (Sotelo *et al.* 2016). Zaelani *et al.* (2019) menyatakan bahwa glisina juga berperan membentuk tiga rantai alfa heliks menjadi struktur super heliks. Komposisi asam amino kolagen gelembung renang ikan tuna dapat dilihat pada *Table 2*.

Selain asam amino glisina, terdapat juga asam amino arginina dan prolina yang komposisinya cukup tinggi pada kolagen gelembung renang ikan tuna. Asam amino prolina dan hidrosiprolina merupakan kunci dalam utuhnya struktur kolagen dan keberadaannya dalam protein kolagen dapat mempertahankan struktur tripel heliks kolagen (Nurubhasha *et al.* 2019). Menurut Hu *et al.* (2016) bahwa komposisi asam amino dapat berbeda-beda tergantung pada

jaringan bahan dan metode isolasi yang berbeda. Penghilangan protein non-kolagen selama proses isolasi kemungkinan juga mengakibatkan perubahan komposisi asam amino antara bahan baku dan kolagen.

Kandungan asam amino tirosina dan histidina dapat dipengaruhi oleh penggunaan enzim papain karena dapat menguraikan ikatan antara tirosina dan histidina sehingga menghasilkan kandungan yang rendah dibandingkan asam amino jenis lainnya. Hal ini didukung oleh Li *et al.* (2020) bahwa penggunaan enzim dapat menguraikan asam amino tirosina dan histidina sehingga berdampak pada kandungan yang sedikit pada kedua jenis asam amino tersebut. Matmaroh *et al.* (2011) menambahkan bahwa perbedaan komposisi asam amino dapat disebabkan oleh penghilangan beberapa bagian wilayah telopeptida yang difasilitasi oleh penggunaan enzim.

Table 2 Amino acid composition of tuna swim bladder collagen and several other species

Amino acids	Collagen amino acid composition (mg/g)			
	<i>Thunnus</i> sp. ¹ (PaSC)	<i>Pangasius</i> sp. ² (PaSC)	<i>Ctenopharyngodon</i> <i>idella</i> ³ (PSC)	<i>Thunnus</i> <i>albacares</i> ⁴ (ASC)
Serine	37.02	36.29	34	50
Glutamic acid	56.90	75.34	80	97
Phenylalanine	39.03	26.86	15	22
Isoleucine	14.30	16.13	12	25
Valine	23.24	23.11	23	38
Alanine	56.70	90.02	128	102
Arginine	91.10	111.7	55	56
Glycine	190.62	276.98	340	225
Lysine	19.28	34.62	28	44
Aspartic acid	75.04	12.08	50	69
Leucine	34.21	29.1	21	47
Tyrosine	30.71	3.85	3	15
Proline	76.57	119.61	97	80
Threonine	38.30	25.19	30	42
Histidine	13.06	12.05	4	12

Note: ¹Research data, ²Simamora *et al.* (2019), ³Liu *et al.* (2015), ⁴Kaewdang *et al.* (2014)

Bobot Molekul Kolagen Gelembung Renang Ikan Tuna

Prinsip analisis SDS-PAGE adalah dengan menambahkan sampel ke denaturan protein yang mengandung SDS, sehingga permukaan molekul protein terikat dengan SDS dan bermuatan negatif sehingga mengurangi perbedaan muatan antarmolekul protein. Pergerakan dan distribusi protein dipengaruhi oleh ukuran dan bentuk berat molekul protein, apabila berat molekul semakin besar, maka semakin lambat gerakannya. Jika berat molekul kecil maka pergerakannya semakin cepat (Li *et al.* 2020). Hasil pengujian bobot molekul kolagen gelembung renang ikan tuna dapat dilihat pada *Figure 4*.

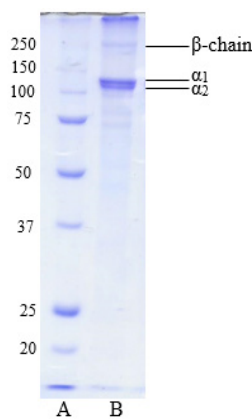


Figure 4 Protein pattern: (A) marker, (B) tuna swim bladder collagen

Kolagen gelembung renang ikan tuna pada penelitian ini memiliki pita protein rantai α_1 sebesar 117 kDa, rantai α_2 sebesar 107 kDa dan rantai β sebesar 244 kDa yang merupakan pencari kolagen tipe I. Menurut Yu *et al.* (2018) bahwa kolagen tipe I merupakan kolagen utama yang ditemukan dalam produk hasil samping ikan dicirikan dengan keberadaan rantai α_1 , α_2 dan β . Hasil tersebut mendekati hasil penelitian Zhang *et al.* (2011) yang mengisolasi kolagen dari sisik ikan air tawar dengan bobot molekul pita rantai α_1 sebesar 117,3 kDa dan pita rantai α_2 sebesar 107,4 kDa. Namun hasil ini masih lebih rendah dibandingkan bobot molekul kolagen gelembung renang ikan tuna madidihang dengan metode ekstraksi asam dengan hasil rantai α_1 sebesar 131,346 kDa, rantai α_2 sebesar 120,440 kDa (Hadinoto *et al.* 2019).

Keberadaan rantai β pada kolagen gelembung renang ikan tuna menunjukkan bahwa kolagen mengandung ikatan silang antarmolekul. Ikatan silang rantai yang berdekatan dapat menjadi dimer atau rantai β , sehingga dapat menghambat pelipatan protein kolagen yang tepat untuk menjadi konformasi triple heliks (Carvalho *et al.* 2018). Intensitas pita rantai β pada kolagen gelembung renang ikan tuna sangat lemah sedangkan pita rantai α_1 dan α_2 sangat jelas terlihat, hal ini dapat disebabkan oleh hancurnya ikatan silang intra dan antarmolekul kolagen oleh penambahan enzim, rantai β terdegradasi menjadi rantai α (Cheng *et al.* 2017). Jamilah *et al.* (2013) menyatakan bahwa enzim papain menunjukkan reaksi hidrolitik yang lebih kuat terhadap matriks kolagen yang membelah peptida tidak hanya pada bagian telopeptida namun juga didalam tropokolagen. Menurut Rifqi *et al.* (2020) bahwa hasil bobot molekul yang rendah berkorelasi dengan adanya penambahan enzim karena pada saat proses ekstraksi protein akan terpecah menjadi peptida yang lebih pendek sehingga akan menurunkan berat molekulnya. Blanco *et al.* (2019) menyatakan bahwa kolagen dengan bobot molekul yang rendah dapat disebabkan oleh kondisi proses isolasi seperti suhu, waktu dan konsentrasi asam yang digunakan.

Zeta Potensial Kolagen Gelembung Renang Ikan Tuna

Nilai zeta potensial yang tinggi akan memberikan stabilitas yang tinggi pada kolagen untuk menahan agregasi. Sebaliknya, jika nilai zeta potensial kecil atau mendekati nol, memungkinkan adanya gaya tarik menarik yang lebih besar daripada gaya tolak-menolak dan dispersi dapat membentuk agregat (Tan dan Chang 2018). Hasil pengukuran nilai zeta potensial kolagen gelembung renang ikan tuna dapat dilihat pada *Figure 5*.

Nilai zeta potensial kolagen gelembung renang ikan tuna sebesar 0,496 mV, hasil ini masih lebih besar dibandingkan hasil Ivanova dan Petrova (2019) yakni -35 mV. Hasil pengujian nilai zeta potensial pada kolagen dari gelembung renang ikan tuna bernilai nol karena berada pada titik isoelektrik

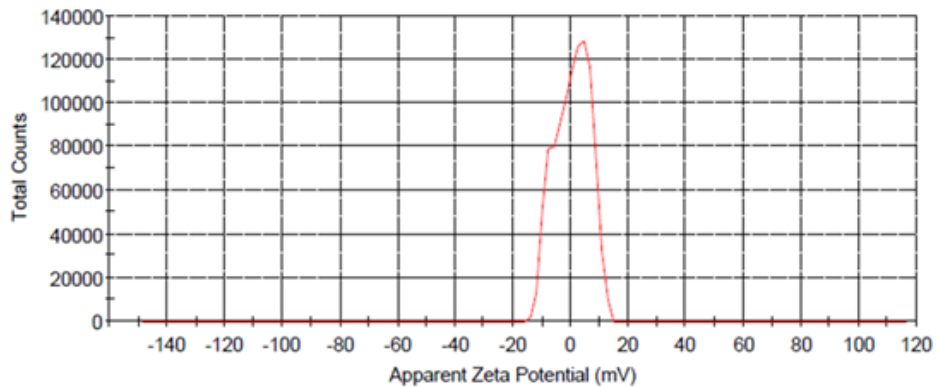


Figure 5 The zeta potential distribution graph of tuna swim bladder collagen

kolagen yang berkaitan dengan kandungan asam amino yang bersifat asam seperti asam glutamat dan asam aspartat. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Ali *et al.* (2017) bahwa muatan bersih nol pada kolagen dari sisik ikan temoleh (*Probarbus jullieni*) menjadi titik isoelektrik yang berkorelasi dengan tingginya kandungan gugus karboksilat terutama dari asam amino asam misalnya asam glutamat dan asam aspartat. Menurut Upasen *et al.* (2019) bahwa molekul protein dalam sistem berair memiliki muatan bersih nol, muatan permukaan bersih kolagen yang diekstraksi dari sisik kerapu (*Epinephelus lanceolatus*) pada waktu ekstraksi yang berbeda adalah nol pada pH kisaran sekitar 3,2-4,0 yang mendekati pH berbagai jenis kolagen.

Nilai zeta potensial 0 hingga ± 5 mV menggambarkan bahwa kolagen mengalami flokulasi. Pada kondisi pH mendekati titik isoelektrik, molekul kolagen menjadi tidak stabil dan cenderung menggumpal atau berflokulasi karena terjadi peningkatan interaksi hidrofobik antar molekul kolagen (Ahmad *et al.* 2016). Menurut Hong *et al.* (2017) bahwa partikel pada titik isoelektriknya sangat rentan terhadap aglomerasi karena tolakan elektrostatis tidak cukup untuk mengatasi gaya tarik-menarik dari interaksi hidrofobik antar partikel.

Nilai zeta potensial yang setara dengan nol juga mewakili titik isoelektrik kolagen, di mana pada titik ini kolagen cenderung bersifat hidrofobik, padat dan kurang stabil dikarenakan tidak adanya gaya tolak menolak antar partikel yang berdampak pada hilangnya interaksi dengan pelarut dan endapan (Oliveira *et al.* 2021). Menurut Chen *et al.*

(2016) bahwa nilai titik isoelektrik kolagen dapat berbeda-beda karena berbagai urutan asam amino dan sebaran residu asam amino. Li *et al.* (2020) menyatakan bahwa secara umum titik isoelektrik kolagen dari berbagai organisme dapat berbeda-beda karena adanya perbedaan komposisi asam amino.

KESIMPULAN

Pemanfaatan ultrasonikasi dalam penurunan kadar protein nonkolagen dalam gelembung renang dapat membantu memaksimalkan proses praekstraksi. Kolagen gelembung renang ikan tuna yang diekstrak menggunakan enzim papain dengan konsentrasi 5.000 U/g selama 36 jam merupakan perlakuan terpilih dalam menghasilkan kolagen yang bermutu dengan ciri-ciri rendemen yang cukup tinggi, adanya asam amino penyusun kolagen dan pita protein penciri kolagen.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad M, Nirmal NP, Chuprom J. 2016. Molecular characteristics of collagen extracted from the starry triggerfish skin and its potential in the development of biodegradable packaging film. *RSC Advances*. 6:33868-33879.
- Ahmed R, Haq M, Chun B-S. 2019. Characterization of marine derived collagen extracted from the by-products of bigeye tuna (*Thunnus obesus*). *International Journal of Biological Macromolecules*. (135):668-676.
- Ali AMM, Benjakul S, Kishimura H. 2017. Molecular characteristics of acid and pepsin soluble collagens from the scales

- of golden carp (*Probarbus jullieni*). *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 29(6):450-457.
- Amri E, Mamboya F. 2012. Papain, A plant enzyme of biological importance: a review. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*. 8(2): 99-104.
- Arumugam GKS, Sharma D, Balakrishnan RM, Ettiyappan JBP. 2018. Extraction, optimization and characterization of collagen from sole fish skin. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*. 9:19-26.
- Ashraf F, Koshy AV, Vidya M, Baldwin P, Bakr MA. 2017. Basics of collagen. *International Journal of Current Medical and Pharmaceutical Research*. 3(6):1894-1896.
- Astashev VK, Babitsky VI. 2007. *Ultrasonic Processes and Machines. Dynamics, Control and Applications*. New York (US): Springer.
- Astiana I, Nurjanah, Nurhayati T. 2016. Karakteristik kolagen larut asam dari kulit ikan ekor kuning. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 19(1):79-93.
- Blanco M, Vazquez JA, Perez-Martin RI, Sotelo CG. 2019. Collagen extraction optimization from the skin of the small-spotted catshark (*S. canicula*) by response surface methodology. *Marine Drugs*. 17(40):1-14.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72:248-254.
- [BSN] Badan Standardisasi Nasional. 1992. SNI 01-2891-1992. Cara uji makanan dan minuman. Jakarta (ID): Badan Standardisasi Nasional.
- Bugg TDH. 2004. *Introduction to Enzyme and Coenzyme Chemistry*. Second Edition. Oxford (UK): Blackwell Publishing.
- Carvalho AM, Marques AP, Silva TH, Reis RL. 2018. Evaluation of the potential of collagen from codfish skin as a biomaterial for biomedical applications. *Marine Drugs*. 16:495.
- Chen J, Li L, Yi R, Xu N, Gao R, Hong B. 2016. Extraction and characterization of acid-soluble collagen from scales and skin of tilapia (*Oreochromis niloticus*). *LWT-Food Science and Technology*. 66:453-459.
- Chen Y, Jin H, Yang F, Jin S, Liu C, Zhang L, Huang J, Wang S, Yan Z, Cai X, Zhao R, Yu F, Yang Z, Ding G, Tang Y. 2019. Physicochemical, antioxidant properties of giant croaker (*Nibea japonica*) swim bladders collagen and wound healing evaluation. *International Journal of Biological Macromolecules*. 138:483-491.
- Cheng X, Shao Z, Li C, Yu L, Raja MA, Liu C. 2017. Isolation, characterization and evaluation of collagen from jellyfish *Rhopilema esculentum* Kishinouye for use in hemostatic applications. *PLOS ONE*. 12(1):1-21.
- Gadi DS, Trilaksana W, Nurhayati T. 2017. Histologi, ekstraksi dan karakterisasi kolagen gelembung renang ikan cunang (*Muarenesox talabon*). *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis*. 9(2):665-683.
- Gonzales-Felix ML, Perez-Velazquez M, Castellanos-Rico M, Sachs AM, Gray LD, Gaines SD, Goto GM. 2021. First report on the swim bladder index, proximate composition, and fatty acid analysis of swim bladder from cultured *Totoaba macdonaldi* fed compound aquafeeds. *Aquaculture Report*. 21(100901):1-8.
- Gulzar S, Benjakul S. 2018. Ultrasound waves increase the yield and carotenoid content of lipid extracted from cephalothorax of Pacific white shrimp (*Litopenaus vannamei*). *European Journal of Lipid Science and Technology*. 120(5):1-36.
- Haaparanta AM, Koivurinta J, Hamalainen ER, Kellomaki M. 2008. The effect of cross-linking time on a porous freeze-dried collagen scaffold using 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide as a cross-linker. *Journal of Applied Biomaterial and Biomechanics*. 6(2):89-94.
- Hadinoto S, Kolanus JPM, Idrus S. 2019. Karakterisasi gelembung renang ikan tuna sirip kuning (*Thunnus* sp.) dan kolagen yang dihasilkan melalui ekstraksi asam asetat. *JPB Kelautan dan Perikanan*. 14(2):129-140.
- Hickman D, Sims TJ, Miles CA, Bailey AJ, Mari MD, Koopmans M. 2000. Isinglass/

- collagen: denaturation and functionally. *Journal of Biotechnology*. 79:245-257.
- Hong H, Akbari A, Wu J. 2017. Small amphipathic peptides are responsible for the assembly of cruciferin nanoparticles. *Nature Scientific Reports*. 7(7819):1-13.
- Hou H, Li B, Zhang Z, Xue C, Yu G, Wang J, Bao Y, Bu L, Sun J, Peng Z, Su S. 2012. Moisture absorption and retention properties, and activity in alleviating skin photodamage of collagen polypeptide from marine fish skin. *Food Chemistry*. 135(3):1432-1439.
- Hu J, Li T, Liu X, Liu D. 2016. Seasonal variation of acid-soluble collagens extracted from the swim bladders and skins of bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) and grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Food Bioscience*. 15(2016):27-33.
- Huang CY, Kuo JM, Wu SJ, Tsai HT. 2016. Isolation and characterization of fish scale collagen from tilapia (*Oreochromis* sp.) by a novel extrusion-hydro-extraction process. *Food Chemistry*. 190(2016):997-1006.
- Idrus S, Hadinoto S, Kolanus JPM. 2018. Karakterisasi kolagen gelembung renang tuna sirip kuning (*Thunnus albacares*) dari perairan Maluku menggunakan ekstraksi asam. *Biopropal Industri*. 9(2): 87-94.
- Ivanova SE, Petrova NN. 2019. Collagen-containing products derived from the swim bladders of northern fish and their application. *IOP Publishing: IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 320(01206):1-6.
- Jamilah B, Hartina MRU, Hashim M, Sazili AQ. 2013. Properties of collagen from barramundi (*Lates calcarifer*) skin. *International Food Research Journal*. 20(2):835-842.
- Jeevithan E, Wu W, Nanping W, Lan H, Bao B. 2014. Isolation, purification and characterization of pepsin soluble collagen isolated from silvertip shark (*Carcharhinus albimarginatus*) skeletal and head bone. *Process Biochemistry*. 49:1767-1777.
- Jeevithan E, Bao B, Bu Y, Zhuo Y, Zhao Q, Wu W. 2014b. Type II collagen and gelatin from silvertip shark (*Carcharhinus albimarginatus*) cartilage: isolation, purification, physicochemical and antioxidant properties. *Marine Drugs*. 12:3852-3873.
- Kaewdang O, Benjakul S, Kaewmanee T, Kishimura H. 2014. Characteristics of collagens from the swim bladders of yellow fin tuna (*Thunnus albacares*). *Food Chemistry*. 155:264-270.
- Kartika IWD, Trilaksana W, Adnyane IKM. 2016. Karakterisasi kolagen dari limbah gelembung renang ikan cuanang (*Muraenesox talabon*) hasil ekstraksi asam dan hidrotermal. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 19(3):222-232.
- Kim JS, Park JW. 2004. Characterization of acid-soluble collagen from pacific whiting surimi processing byproducts. *Journal of Food Science*. 69(8):1-6.
- Kittiphattanabawon P, Benjakul S, Visessanguan W, Nagai T, Tanaka M. 2005. Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of big eye snapper (*Priacanthus tayenus*). *Food Chemistry*. 89:363-372.
- [KKP] Kementerian Kelautan dan Perikanan. 2021. *Produksi perikanan tangkap laut jenis ikan tuna*. Statistik KKP. [Internet]. (diunduh pada 18 Januari 2022) Tersedia pada laman <https://statistik.kkp.go.id/home.php?.m=total&i=2#panel-footer>
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*. 227(5259):680-685.
- Li ZR, Wang B, Chi CF, Zhang QH, Gong YD, Tang JJ, Luo HY, Ding GF. 2013. Isolation and characterization of acid soluble collagens and pepsin soluble collagens from the skin and bone of Spanish mackerel (*Scomberomorus niphonius*). *Food Hydrocolloids*. 31:103-113.
- Li PH, Lu WC, Chan YJ, Ko WC, Jung CC, Huynh DTL, Ji YX. 2020. Extraction and characterization of collagen from sea cucumber (*Holothuria cinerascens*) and its potential application in moisturizing cosmetics. *Aquaculture*. 515:734590.
- Li J, Li Y, Li Y, Yang Z, Jin H. 2020. Physicochemical properties of collagen

- from *Acaudina molpadioides* and its protective effects against H₂O₂-induced injury in RAW264.7 cells. *Marine Drugs*. 18(370):1-13.
- Liang Q, Wang L, Sun W, Wang Z, Xu J, Ma H. 2014. Isolation and characterization of collagen from the cartilage of amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*). *Process Biochemistry*. 49(2):318-323.
- Liu D, Zhang X, Li T, Yang H, Zhang H, Regenstein JM, Zhou P. 2015. Extraction and characterization of acid-and pepsin-soluble collagens from the scales skins and swim-bladders of grasscarp (*Ctenopharyngodon idella*). *Food Bioscience*. 9:68-74.
- Matmaroh K, Benjakul S, Prodpran T, Encarnacion AB, Kishimura H. 2011. Characteristics of acid soluble collagen and pepsin soluble collagen from scale of spotted golden goatfish (*Parupeneus heptacanthus*). *Food Chemistry*. 129:1179-1186.
- Mustafida H, Darmanto YS, Anggo AD. 2019. Pengaruh berbagai jenis gelatin kulit ikan terhadap karakteristik kekian ikan nila (*Oreochromis niloticus*). *Saintek Perikanan: Indonesian Journal of Fisheries Science and Technology*. 15(1):19-25.
- Muyonga JH, Cole CGB, Duodu KG. 2004. Characterization of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). *Food Chemistry*. 85(1):81-89.
- Nollet LML. 1996. *Handbook of Food Analysis: Physical characterization dan nutrient analysis*. Second Edition. New York (US): CRC Press LLC.
- Ng HW, Zhang Y, Naffa R, Prabakar S. 2020. Monitoring the degradation of collagen hydrogels by collagenase *Clostridium histolyticum*. *Gels*. 6(46):1-12.
- Nurhayati T, Nurjanah, Astiana I. 2018. Characteristics of papain soluble collagen from redbelly yellowtail fusilier (*Caesio cuning*). *IOP Publishing: IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 196(012034):1-9.
- Nurnadia AA, Azrina A, Amin I. 2011. Proximate composition and energetic value of selected marine fish and shellfish from the west coast of peninsular Malaysia. *International Food Research Journal*. 18:137-148.
- Nurubhasha R, Kumar NSS, Thirumalasetti SK, Simhachalam G, Dirisala VR. 2019. Extraction and characterization of collagen from the skin of *Pterygoplichthys pardalis* and its potential application in food industries. *Food Science and Biotechnology*. 28(6):1811-1817.
- Oliveira VDM, Assis CRD, Costa BDAM, Neri RCDA, Monte FTD, Freitas HMSDCV, Franca RCP, Santos JF, Bezerra RDS, Porto ALF. 2021. Physical, biochemical, densitometric and spectroscopic techniques for characterization collagen from alternative sources: A review based on the sustainable valorization of aquatic by-products. *Journal of Molecular Structure*. 1224(129023):1-28.
- Ong TY, Shaik MI, Sarbon NM. 2021. Isolation and characterization of acid and pepsin soluble collagen extracted from sharpnose stingray (*Dasyatis zugei*) skin. *Food Research*. 5(3):214-224.
- Pan BS, Chen HE, Sung WC. 2018. Molecular and thermal characteristics of acid-soluble collagen from orbicular batfish: effects of deep-sea water culturing. *International Journal of Food Properties*. 21(1):1080-1090.
- Petcharat T, Benjakul S, Karnjanapratum S, Nalinanon S. 2020. Ultrasound-assisted extraction of collagen from clown featherback (*Chitala ornata*) skin: yield and molecular characteristics. *Journal of Science Food and Agriculture*. 2020:1-11.
- Prastyo DT, Trilaksana W, Nurjanah. 2020. Aktivitas antioksidan hidrolisat kolagen kulit ikan nila (*Oreochromis niloticus*). *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 23(3):423-433.
- Rifqi, Jamhari, Erwanto Y. 2020. Isolation and characterization of collagen from local goat bone using pepsin hydrolysis. *IOP Publishing: IOP Conference Series: Earth Environmental Science*. 492(012083):1-10.
- Schmidt MM, Dornelles RCP, Mello RO, Kubota EH, Mazutti MA, Kempka AP, Demiate IM. 2016. Collagen extraction process. *International Food Research*

- Journal*. 23(3):913-922.
- Sibilla S, Godfrey M, Brewer S, Raja AB, Genovese L. 2015. An overview of the beneficial effects of hydrolysed collagen as a nutraceutical on skin properties: scientific background and clinical studies. *Open Nutraceutical Journal*. 8:29-42.
- Sievers M, Korsoen O, Warren-Myers F, Oppedal F, Macaulay G, Folkedal O, Dempster T. 2021. Submerged cage aquaculture of marine fish: A review of the biological challenges and opportunities. *Review Aquaculture*. 00:1-14.
- Simamora GRR, Trilaksani W, Uju. 2019. Profiling kolagen gelembung renang ikan patin (*Pangasius* sp.) melalui proses enzimatik. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 22(2):299-310.
- Sinthusamran S, Benjakul S, Kishimura H. 2013. Comparative study on molecular characteristics of acid soluble collagens from skin and swim bladder of seabass (*Lates calcarifer*). *Food Chemistry*. 138(2013):2436-2441.
- Song W, Chen W, Yang Y, Li C, Qian G. 2014. Extraction optimization and characterization of collagen from the lung of soft-shelled turtle *Pelodiscus sinensis*. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*. 3(4): 270-278.
- Sotelo CG, Comesana MB, Ariza PR, Perez-Martin RI. 2016. Characterization of collagen from different discarded fish species of the west coast of the Iberian Peninsula. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. 25(3):388-399.
- Stewart J, Hughes JM. 2014. Swim bladder function and buoyancy control in pink snapper (*Pagrus auratus*) and mulloway (*Argyrosomus japonicus*). *Fish Physiology Biochemistry*. 40:335-346.
- Suparno O, Prasetyo NB. 2019. Isolation of collagen from chicken feet with hydro-extraction method and its physico-chemical characterization. *IOP Publishing: IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 335(012018):1-12.
- Tabarestani SH, Maghsoudlou 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.
- Tan Y, Chang SKC. 2018. Isolation and characterization of collagen extracted from channel catfish (*Ictalurus punctatus*) skin. *Food Chemistry*. 242:147-155.
- Triharyuni ST, Prisantoso BI. 2012. Komposisi jenis dan sebaran ukuran tuna hasil tangkapan longline diperairan samudera hindia selatan jawa. *Jurnal Sains Perikanan*. 8(1):2012.
- Trilaksani W, Adnyane IKM, Riyanto B, Safitri N. 2020. Nano collagen of the grouper swim bladder in compliance with quality standard of cosmetics materials. *IOP Publishing: IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 404 (012050):1-15.
- Tronci G, Doyle A, Russel SJ, Wood DJ. 2013. Triple-helical collagen hydrogels via covalent aromatic functionalisation with 1,3-phenylenediacetic acid. *Journal of Material Chemistry B Material Biological Medicine*. 1(40):78-88.
- Upasen S, Naeramitmarnsuk K, Antonio C, Roces S, Morillas H, Wattanachai P. 2019. Acid-pepsin soluble collagen from saltwater and freshwater fish scales. *Engineering Journal*. 23(5):183-195.
- Wong DWS. 2018. *Mechanism and Theory in Food Chemistry*. Second Edition. California (US): Springer.
- Wulandari, Suptijah P, Tarman K. 2015. Efektivitas pretreatment alkali dan hidrolisis asam asetat terhadap karakteristik kolagen dari kulit ikan gabus. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 18(3):287-302.
- Yu F, Zong C, Jin S, Zheng J, Chen N, Huang J, Chen Y, Huang F, Yang Z, Tang Y, Ding G. 2018. Optimization of extraction conditions and characterization of pepsin-solubilised collagen from skin of giant croaker (*Nibea japonica*). *Marine Drugs*. 16(29):1-12.
- Zaelani BFD, Safithri M, Tarman K, Setyaningsih I, Meydia. 2019. Collagen isolation with acid soluble method from the skin of Red Snapper

- (*Lutjanus* sp.). IOP Publishing: IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 241(012033):1-10.
- Zeng JN, Jiang BQ, Xiao ZQ, Li SH. 2012. Extraction of collagen from fish scales with papain under ultrasonic pretreatment. *Advanced Material Research*. 366:421-424.
- Zhang F, Wang A, Li Z, He S, Shao L. 2011. Preparation and characterization of collagen from freshwater fish scales. *Food and Nutrition Science*. 2:818-823.
- Zhang J, Duan R, Wang Y, Yan B, Xue W. 2012. Seasonal differences in the properties of gelatins extracted from skin of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Food Hydrocolloids*. 29:100-105.
- Zhao WH, Chi CF, Zhao YQ, Wang B. 2018. Preparation, physicochemical and antioxidant properties of acid- and pepsin-soluble collagens from the swim bladders of Miiuy Croaker (*Miichthys miiuy*). *Marine Drugs*. 16(161):1-19.