

KAPASITAS ANTIOKSIDAN DAN SIFAT FISIOKIMIA HIDROLISAT KOLAGEN DARI KULIT IKAN TUNA SIRIP KUNING DENGAN METODE *ULTRASOUND-ASSISTED ENZYMATIC REACTION*

Raden Hilman Wirayudha¹, Dian Herawati^{*1,2}, Feri Kusnandar^{1,2}, Tati Nurhayati³

¹Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, IPB Dramaga Bogor 16680

²South-East Asia Food and Agricultural Science and Technology Center, IPB Dramaga Bogor 16680

³Departemen Teknologi Hasil Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, IPB Dramaga Bogor 16680

Diterima: 27 September 2022/Disetujui: 21 Oktober 2022

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

Cara sitasi (APA Style 7th): Wirayudha, R. H., Herawati, D., Kusnandar, F., & Nurhayati, T. (2022). Kapasitas Antioksidan dan Sifat Fisikokimia Hidrolisat Kolagen dari Kulit Ikan Tuna Sirip Kuning dengan Metode *Ultrasound Assisted Enzymatic Reaction*. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 25(3), 393-404. <http://dx.doi.org/10.17844/jphpi.v25i3.43325>

Abstrak

Hidrolisat kolagen larut pepsin dari kulit ikan tuna sirip kuning merupakan produk turunan yang diperoleh dari hasil hidrolisis kolagen larut pepsin menggunakan kombinasi proses ekstraksi enzimatik dengan enzim protease (Alkalase[®]) dan ekstraksi fisik dengan metode ultrasonikasi. Tujuan dari penelitian ini yaitu memproduksi kolagen larut pepsin dari bahan baku kulit ikan tuna sirip kuning, mengevaluasi pengaruh waktu sonikasi dan konsentrasi enzim alkalase untuk mendapatkan produk hidrolisat terbaik, serta membandingkan karakteristik fisikokimia, fungsional dan antioksidan dari kolagen larut pepsin dengan hidrolisatnya. Kolagen larut pepsin yang dihasilkan dibuat dengan ekstraksi secara asam menggunakan asam asetat dan juga enzim pepsin dengan konsentrasi 750 U/mg. Analisis data untuk penentuan kondisi hidrolisis optimum menggunakan Rancangan Acak Lengkap Faktorial dengan dua faktor. Hidrolisat kolagen dengan nilai derajat hidrolisis, serta aktivitas penghambatan antioksidan metode DPPH dan ABTS tertinggi diperoleh pada perlakuan penambahan enzim Alkalase[®] sebanyak 2:20 (enzim/mg protein) dengan waktu hidrolisis selama 2 jam menggunakan metode ultrasonikasi. Karakteristik fisikokimia dan sifat antioksidan dari produk hidrolisat kolagen jauh lebih baik jika dibandingkan dengan bentuk utuh kolagen, di antaranya yaitu bobot molekul yang lebih rendah hingga mencapai 5 kDa, asam amino sebesar 56,93%, kelarutan bahan dalam air sebesar 99,54%, dan kapasitas penghambatan antioksidan yang lebih tinggi pada penghambatan DPPH dengan IC₅₀ sebesar 77,2 mg/L dan ABTS IC₅₀ sebesar 40,72 mg/L.

Kata kunci: aktivitas antioksidan, enzim protease, hidrolisat, kolagen larut pepsin, ultrasonikasi

The Antioxidant Capacity and Physicochemical Properties of Yellowfin Tuna Skin Collagen Hydrolysate Using Ultrasound-Assisted Enzymatic Hydrolysis

Abstract

Pepsin soluble collagen hydrolysate from yellowfin tuna skin is a derivative product obtained from the hydrolysis of pepsin soluble collagen using a combination of enzymatic extraction process with protease enzymes (Alcalase[®]) and physical extraction using ultrasonication method. Collagen hydrolysate has many advantages, especially in its wide use and better physicochemical characteristics and functional properties compared to collagen. The aims of this study were to produce collagen pepsin from yellowfin tuna skin, to evaluate the effect of sonication time and concentration of alkalase enzyme to obtain the optimum hydrolysate product, to compare the physicochemical characteristics and antioxidant capacity of pepsin soluble collagen and its hydrolysate. The pepsin soluble collagen was obtained by acid extraction using acetic acid and pepsin enzyme with a concentration of 750 U/mg. Data analysis to determine optimum hydrolysis conditions using a factorial completely randomized design with two factors. The optimum collagen hydrolysate with the highest degree of hydrolysis, as well as antioxidant inhibition of the DPPH and

ABTS methods, was obtained with the addition of 2:20 Alcalase® enzyme (enzyme/mg protein) treatment with a hydrolysis time of 2 hours using the ultrasonication method. The hydrolysis process of collagen into its hydrolysate can improve its physicochemical characteristics and antioxidant capacity, including a lower molecular weight of up to 5 kDa, increased total amino acids up to 56.93%, increased water solubility up to 99.54%, and higher antioxidant capacity inhibition on DPPH method with IC₅₀ of 77.2 mg/L and ABTS method with IC₅₀ of 40.72 mg/L.

Keyword: antioxidant activity, pepsin soluble protein, hydrolysate, protease enzyme, ultrasound

PENDAHULUAN

Produksi perikanan tuna dan cakalang di Indonesia setiap tahunnya selalu mengalami peningkatan produksi dengan memasok lebih dari 16% dari total produksi dunia. Jenis ikan tuna yang terdapat di Indonesia cukup beragam, salah satunya yaitu madidihang atau ikan tuna sirip kuning (*yellowfin tuna*) dengan nama latin *Thunnus albacares* (Kementerian Kelautan dan Perikanan [KKP], 2018). Selama periode 2021, ikan tuna sirip kuning hasil produksi Indonesia telah diekspor ke seluruh dunia sebanyak 1,2 juta ton dengan nilai total valuasi mencapai 4,8 juta USD (Badan Pusat Statistik [BPS], 2021). Jumlah produksi ikan tuna yang besar dapat menghasilkan hasil samping yang menyebabkan peningkatan jumlah limbah yang signifikan salah satunya yaitu kulit ikan tuna. Kulit ikan tuna memiliki karakteristik kimia yang terdiri dari kadar air (58%), kadar protein (37%), kadar lemak (4%), kadar abu (0,5%) (Nurjanah *et al.*, 2021). Berdasarkan kajian tersebut, komponen protein kulit tuna dapat dimanfaatkan menjadi sumber kolagen ikan.

Kolagen merupakan salah satu jenis protein struktural dengan jumlah melimpah pada bagian matriks ekstraseluler yang terdapat pada beberapa bagian jaringan ikat pada tubuh misalnya kulit, tulang, ligamen, tendon, dan tulang rawan. Rantai penyusun kolagen terdiri dari polipeptida yang memiliki sekuens berulang (Gly-X-Y)_n, dengan gugus X dan Y dapat terisi oleh asam amino yang umumnya terdiri dari gugus prolina dan gugus 4-hidroksiprolina (Davison-Kotler *et al.*, 2019). Kolagen yang berasal dari ikan merupakan jenis kolagen tipe 1 dengan asam amino penyusun yang didominasi oleh glisina, prolina, alanina, dan asam glutamat (Nilsuwan *et al.*, 2022). Ekstraksi kolagen dapat menggunakan beberapa cara seperti kimia, basa, campuran asam dan basa,

enzimatis, serta fisik (Schmidt *et al.*, 2016). Enzim dari golongan protease misalnya enzim pepsin dapat digunakan dalam proses ekstraksi karena dapat meningkatkan efisiensi dan efektivitas dari proses ekstraksi kolagen (Liu *et al.*, 2012).

Bentuk lain dari kolagen yang diderivatisasi yaitu hidrolisat kolagen. Hidrolisat kolagen dapat diproduksi dengan proses hidrolisis menggunakan enzim protease (Benjakul *et al.*, 2018). Pemotongan struktur kolagen menjadi lebih sederhana menjadi hidrolisat kolagen dapat secara signifikan berpengaruh terhadap bobot molekul, peningkatan nilai gizi, meningkatkan komponen bioaktif misalnya antioksidan dan sifat fisik berupa solubilitas, sifat emulsi, dan kapasitas pengembangan busa (Jridi *et al.*, 2014).

Hidrolisis kolagen selain menggunakan proses enzimatik, dapat pula menggunakan metode fisik misalnya ultrasonikasi. Ultrasonikasi dapat meningkatkan efisiensi ekstraksi dan mengurangi waktu ekstraksi (Ali *et al.*, 2018). Penelitian terkait pembuatan kolagen hidrolisat menggunakan kombinasi metode enzimatik dan fisik belum banyak dilakukan. Beberapa penelitian tersebut antara lain hidrolisat kolagen kulit salmon (Sae-leaw & Benjakul, 2018), sapi (Vidal *et al.*, 2019), dan unggas (Akram & Zhang, 2019). Pada penelitian ini, kolagen hidrolisat diperoleh dari hidrolisis kolagen kulit ikan tuna menggunakan reaksi enzimatik dengan bantuan ultrasonikasi dengan enzim alkalase. Enzim alkalase diketahui memiliki spektrum yang luas dan mampu memecah peptida menjadi lebih sederhana (Ibrahim & Ghani, 2020). Proses tersebut dapat menghasilkan hidrolisat kolagen dengan tingkat hidrolisis dan aktivitas antioksidan yang tinggi (Sae-leaw & Benjakul, 2018). Penelitian ini dilakukan untuk menerapkan

reaksi enzimatik berbantuan ultrasuara dalam menghasilkan kolagen hidrolisat yang memiliki karakteristik fisikokimia dan kapasitas antioksidan yang lebih baik. Kolagen hidrolisat diharapkan dapat digunakan sebagai bahan tambahan untuk diaplikasikan dalam pangan fungsional. Penelitian ini bertujuan untuk memproduksi kolagen larut pepsin dari bahan baku kulit ikan tuna sirip kuning, mengevaluasi pengaruh waktu sonikasi dan konsentrasi enzim alkalase untuk mendapatkan produk hidrolisat terbaik, serta membandingkan karakteristik fisikokimia fungsional dan antioksidan dari kolagen larut pepsin dengan hidrolisatnya.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan terdiri dari bahan baku utama dan bahan kimia untuk analisis. Kulit ikan tuna sirip kuning yang berasal dari perusahaan perikanan CV Camar Laut, Gorontalo, Indonesia. Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini di antaranya akuades, NaOH (Merck), CH₃COOH (Merck), nitrogen cair, *tris-base* (*Molecular Biology Grade*), HCl (teknis), NaCl (teknis), enzim Alkalase® 2,4 L FG (Novozymes), 2,2 difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) (Sigma), ABTS (Sigma), asam askorbat, BSA (Merck).

Alat yang digunakan dalam preparasi pembuatan hidrolisat protein berupa alat-alat gelas laboratorium, timbangan digital, blender (Kirin), penangas air ultrabunyi (DENSEN model number DSA100-SK2), sentrifugasi (Himac CR 21G), dan *freeze dryer* (CHRIST ALPHA 2,4 LD Plus). Penggunaan alat lain untuk analisis kimia yang digunakan di antaranya kertas saring whatman no 1, tanur pengabuan, *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), desikator, mikropipet tip dan botol gelap. Peralatan yang mendukung penelitian di antaranya alat-alat gelas (Pyrex), mikro pipet (Gilson), vortex (VM-300), inkubator, *microwave*, pH meter (Thermo Scientific), dan spektrofotometer UV-Vis (UV-Mini 1240, Shimadzu, Jepang).

Metode

Preparasi sampel

Kulit ikan yang sebelumnya disimpan

dan akan digunakan, dicuci menggunakan air bersih yang mengalir. Tujuannya agar seluruh pengotor dan lemak yang tersisa pada kulit ikan menjadi berkurang. Sampel yang telah bersih selanjutnya dilakukan pemotongan menjadi ukuran-ukuran kecil, ditimbang dan dianalisis proksimat yang terdiri dari kadar air, kadar abu, kadar lemak, dan kadar protein (Association of Official Analytical Chemists [AOAC], 2012).

Ekstraksi kolagen larut pepsin dari kulit ikan tuna (Nurhayati *et al.*, 2021)

Proses pembuatan kolagen kulit ikan tuna diawali dengan proses preparasi kulit ikan tuna sirip kuning. Kulit ikan tuna dibersihkan dari sisik dan pigmen warna yang menempel. Tahap selanjutnya yaitu proses pemotongan kulit menjadi bagian kecil berbentuk persegi dengan ukuran 2x2 cm. Selanjutnya, kulit tersebut dimasukkan ke dalam wadah untuk tahap praperlakuan yaitu deproteinasi dengan penambahan NaOH 0,1 N (1:10) (b/v) selama 12 jam pada suhu *chilling* (10°C). Pada proses ini, pergantian larutan NaOH dilakukan setiap dua jam sekali. Netralisasi komponen kulit yang telah dideproteinasi tersebut dengan air atau akuades hingga pH menyentuh 7. Langkah selanjutnya yaitu proses hidrolisis pertama dengan menggunakan CH₃COOH 0,5 M (1:15) (b/v) pada suhu 10°C selama tiga hari, dengan proses pengadukan selama 10 menit secara konstan yang dilakukan setiap delapan jam sekali. Hasil dari proses hidrolisis menggunakan asam asetat tersebut menghasilkan supernatan (larutan) dan sisaan kulit (filtrat). Bagian filtrat diambil untuk selanjutnya dihidrolisis menggunakan enzim pepsin dengan aktivitas 750 U/g (1:15) (b/v) pada suhu ruang diikuti dengan proses pengadukan selama 15 menit setiap enam jam sekali setiap hari. Setelah proses hidrolisis selesai, langkah selanjutnya yaitu tahap presipitasi menggunakan TrisNaCl 1,8 M (1:1) (v/v) selama 24 jam pada suhu *chilling*. Hasil presipitasi tersebut akan menghasilkan endapan putih yang terdapat di bagian permukaan larutan. Endapan tersebut diambil untuk selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 10.000xg selama 30 menit pada suhu 4°C. Bagian pelet dari hasil sentrifugasi

diambil untuk kemudian ditambahkan asam asetat 0,5 M (1:2) (b/v) dan didialisis menggunakan kantung dialisis (14 kDa) yang direndam menggunakan larutan asam asetat 0,1 M (1:5) (v/v) selama 24 jam. Tahapan terakhir yaitu proses dialisis lanjutan dengan mengganti larutan perendam menjadi akuades (1:5) (v/v) selama 24 jam. Hasil dialisis tersebut kemudian disebut sebagai produk kolagen larut pepsin untuk selanjutnya digunakan pada proses pembuatan hidrolisat kolagen.

Ekstraksi hidrolisat kolagen metode gabungan enzimatis dan ultrasonikasi (Modifikasi Blanco *et al.*, (2017); Vidal *et al.*, (2019)).

Proses pembuatan hidrolisat kolagen diawali dengan proses *thawing* larutan kolagen larut pepsin yang telah dibuat. Langkah selanjutnya yaitu menaikkan pH larutan kolagen menjadi delapan menggunakan NaOH 2N. Ekstraksi dilakukan dengan memanaskan penangas air pada alat ultrabunyi (40 kHz, 100 W) hingga mencapai 55°C kemudian sampel larutan kolagen dimasukan dan ditambahkan dengan enzim alkalase dengan berbagai rentang konsentrasi (enzim/protein) yaitu (0,5:20), (1:20), (2:20) (b/b). Proses hidrolisis dilakukan selama dengan rentang waktu satu jam dan dua jam. Setelah selesai, inaktivasi enzim dilakukan dengan memanaskan sampel pada suhu 90°C selama 15 menit. Hidrolisat kolagen kemudian dilakukan berbagai analisis misalnya derajat hidrolisis (Haslaniza *et al.*, 2010), dan presentasi inhibisi antioksidan metode DPPH (Wang *et al.*, 2013) dan ABTS (Wang *et al.*, 2013) untuk mencari perlakuan hidrolisis yang paling optimal. Hasil hidrolisat terbaik kemudian dikeringkan menggunakan *freeze dryer* untuk didapat bubuk hidrolisat yang kemudian dilakukan berbagai analisis fisikokimianya berupa profil asam amino (Nollet, 1996), profil bobot molekul (Laemmli, 1970), kelarutan protein (Jongjareonrak *et al.*, 2005), pH (Apriyantono *et al.*, 1985), kelarutan bahan dalam air (Shon *et al.*, 2011), daya serap air (Adeleke & Odedeji, 2010), daya serap minyak (Adeleke & Odedeji, 2010), serta antioksidan metode DPPH (Wang *et al.*, 2013) dan ABTS (Nantitanon *et al.*, 2007).

Analisis Data

Penentuan kondisi optimum hidrolisat kolagen menggunakan Rancangan Acak Lengkap Faktorial dengan dua faktor. Faktor pertama yaitu perbedaan waktu hidrolisis (A) terdiri atas dua taraf, yaitu satu jam dan dua jam. Faktor kedua yaitu perbedaan konsentrasi enzim (B), terdiri atas tiga taraf yaitu 0,5%, 1% dan 2%. Analisis sidik ragam (ANOVA) dilakukan menggunakan perangkat lunak SPSS (IBM® SPSS Statistics 26) untuk mengetahui adanya signifikansi perlakuan terhadap hasil penelitian. Perlakuan yang memberikan signifikansi kemudian dilakukan analisis lanjutan menggunakan Duncan Multiple Range Test (DMRT) untuk mengetahui perlakuan yang berbeda nyata pada taraf 5%.

Analisis terhadap kolagen dan hidrolisat kolagen menggunakan Uji T untuk mengetahui signifikansi antara kedua perlakuan dengan taraf signifikansi 5% menggunakan perangkat lunak SPSS. Analisis penentuan bobot molekul menggunakan aplikasi Photocapt™.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penentuan Kondisi Optimum Hidrolisis

Hasil pengukuran parameter derajat hidrolisis, kapasitas penghambatan DPPH dan ABTS pada sampel hidrolisat kolagen dapat dilihat pada Tabel 1. Berdasarkan uji ragam, parameter derajat hidrolisis secara signifikan dipengaruhi oleh faktor konsentrasi enzim dan waktu sonikasi ($p < 0,05$), namun antara kedua faktor tersebut tidak memberikan pengaruh yang signifikan ($p > 0,05$). Perlakuan penambahan enzim dengan konsentrasi 2% dan waktu hidrolisis menggunakan ultrasonikasi selama dua jam memiliki nilai derajat hidrolisis yang paling tinggi yaitu sebesar 54,44%. Nilai derajat hidrolisis yang semakin tinggi menandakan jika terdapat peningkatan jumlah peptida serta asam amino yang terlarut pada TCA akibat pemutusan ikatan peptida yang terjadi selama proses hidrolisis.

Perbedaan nilai derajat hidrolisis pada suatu sampel juga dapat dipengaruhi oleh perbedaan jenis dan konsentrasi

enzim, serta lama waktu hidrolisis (Haslaniza *et al.*, 2010). Nilai derajat hidrolisis dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor di antaranya yaitu jenis dan konsentrasi enzim yang digunakan. Enzim alkalase yang digunakan pada penelitian Araujo *et al.* (2021) dapat meningkatkan nilai derajat hidrolisis dan menghasilkan nilai tertinggi untuk proses hidrolisis protein jika dibandingkan dengan beberapa enzim protease. Ultrasonikasi pada proses hidrolisis dapat berpengaruh secara signifikan terhadap peningkatan nilai derajat hidrolisis pada sampel. Proses hidrolisis menggunakan ultrasonikasi dapat mengefisienkan waktu hidrolisis sehingga proses dapat berjalan dengan waktu yang lebih cepat jika dibandingkan dengan hidrolisis tanpa menggunakan ultrasonikasi (Guerra-Almonacid *et al.*, 2019).

Parameter persentase penghambatan antioksidan metode DPPH dan ABTS, perlakuan penambahan enzim 2% dan waktu sonikasi selama dua jam menghasilkan nilai penghambatan antioksidan paling tinggi yaitu sebesar 66,14% pada DPPH dan ABTS sebesar 90,28%. Berdasarkan uji sidik ragam, diketahui bahwa faktor konsentrasi enzim

dan waktu sonikasi berpengaruh secara signifikan ($p < 0,05$) terhadap presentase inhibisi antioksidan pada metode DPPH dan ABTS. Selain itu, terdapat interaksi yang signifikan antara kedua faktor tersebut ($p < 0,05$). Faktor yang dapat memengaruhi kapasitas antioksidan di antaranya yaitu perbedaan konsentrasi enzim alkalase, waktu hidrolisis, dan metode ekstraksi. Beberapa faktor lain yang menentukan nilai persentase inhibisi DPPH dan ABTS misalnya perbedaan jenis enzim protease, dan kondisi enzimolisis berupa konsentrasi, suhu dan waktu hidrolisis. Enzim protease memiliki spesifitasnya dalam proses pemotongan polipeptida sehingga dapat menghasilkan perbedaan urutan sekuen asam amino yang akan berpengaruh terhadap kapasitas antioksidan (Liu *et al.*, 2012).

Metode ultrasonikasi yang digunakan dalam proses hidrolisis kolagen juga dapat menjadi faktor yang sangat menentukan kapasitas antioksidan. Ultrasonikasi dapat menunjang kondisi hidrolisis sehingga fraksi protein dengan bobot molekul yang besar dapat terdegradasi menjadi ukuran yang lebih kecil. Peptida yang memiliki bobot yang rendah dapat menyumbang

Tabel 1 Nilai derajat hidrolisis (DH) dan penghambatan radikal (DPPH dan ABTS) hidrolisat kolagen dari perbedaan konsentrasi dan waktu sonikasi

Parameter	Durasi (jam)	Konsentrasi enzim alkalase			Rata-rata durasi sonikasi
		0,5:20	1:20	2:20	
DH(%)	1	42,47±3,02	41,60±3,02	50,87±3,02	44,98±1,74 ^b
	2	42,89±3,02	46,49±3,02	58,01±3,02	49,13±1,74 ^a
	Rata-rata	42,68±2,13 ^b	44,05±2,13 ^b	54,44±2,13 ^a	(-)
ABTS (% inhibisi)	1	78,04±1,00 ^{cd}	77,00±1,00 ^d	79,82±1,00 ^c	78,29±0,58 ^b
	2	84,27±1,00 ^b	86,20±1,00 ^b	90,28±1,00 ^a	86,92±0,58 ^a
	Rata-rata	81,16±0,71 ^b	81,60±0,71 ^b	85,05±0,71 ^a	(+)
DPPH (% inhibisi)	1	54,59±0,29 ^d	52,72±0,29 ^e	46,91±0,29 ^f	51,41±0,17 ^b
	2	61,68±0,29 ^c	64,48±0,29 ^b	66,14±0,29 ^a	64,1±0,17 ^a
	Rata-rata	58,13±0,21 ^b	58,60±0,21 ^a	56,52±0,21 ^c	(+)

Keterangan: Nilai rata-rata kolom dan baris yang diikuti huruf berbeda menunjukkan berbeda nyata ($p < 0,05$). Nilai interaksi dua faktor yang diikuti huruf berbeda adalah signifikan. Nilai merupakan rerata dan simpangan baku (n=4). Rata-rata [] : Rata-rata efek dari konsentrasi enzim. (+) : Interaksi antara durasi sonikasi dan konsentrasi enzim berbeda secara signifikan. (-) : Interaksi antara durasi sonikasi dan konsentrasi enzim tidak berbeda secara signifikan

elektron yang kemudian dapat bereaksi dengan radikal bebas sehingga menjadi lebih stabil lalu reaksi oksidasi dapat terhenti (Guerra-Almonacid *et al.*, 2019).

Perbandingan Karakteristik *Pepsin Soluble Collagen* dan Hidrolisat Kolagen Profil Bobot Molekul Peptida

Profil bobot molekul peptida dari kolagen larut pepsin dan hidrolisat kolagen dapat dilihat pada Gambar 1. Pola SDS-PAGE pada kolagen larut pepsin tersusun atas dua rantai alfa yang berdampingan ($\alpha 1$ dan $\alpha 2$), rantai β , serta rantai γ . Tipe bobot molekul kolagen larut pepsin pada penelitian ini berjenis kolagen Tipe I yang umumnya ditemukan pada produk kolagen dari bahan baku ikan. Posisi elektroforesis rantai α -1 memiliki bobot molekul ~ 148 kDa dan rantai α -2 yaitu sebesar ~ 115 kDa. Sedangkan, hidrolisat kolagen yang diekstraksi dengan enzim alkalase dan ultrasonikasi selama dua jam memiliki nilai bobot molekul tertinggi mencapai ~ 70 kDa, sedangkan bobot molekul terendah yang terukur mencapai ~ 5 kDa.

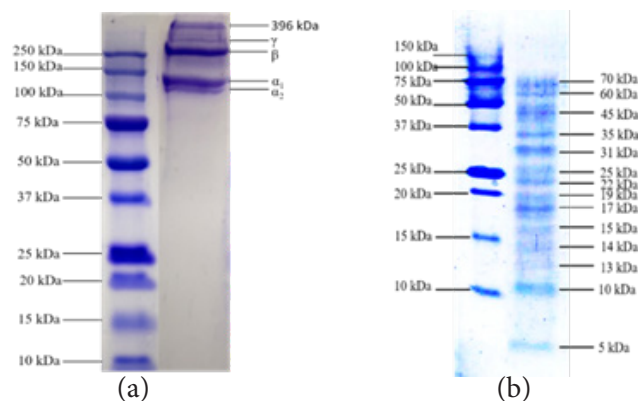
Metode ekstraksi pembuatan kolagen umumnya dapat mempertahankan integritas strukturalnya, sehingga setiap kolagen (khususnya Tipe I) selalu memiliki ciri khas rantai α berdampingan ($\alpha 1$ dan $\alpha 2$) (Li *et al.*, 2013). Proses hidrolisis yang dilakukan dengan metode gabungan (enzimatis dan ultrasonikasi) terbukti mampu memotong protein kolagen larut pepsin dengan bobot molekul yang lebih rendah. Perbedaan pola dan ukuran bobot molekul dapat disebabkan

oleh beberapa hal di antaranya suhu, waktu inkubasi, konsentrasi enzim, serta jenis enzim yang digunakan (Pham *et al.*, 2018).

Komposisi Asam Amino

Hasil analisis komposisi asam amino dapat dilihat pada Tabel 2. Jumlah total asam amino pada sampel kolagen larut pepsin yaitu sebesar 54,26%. Sedangkan total asam amino pada sampel hidrolisat kolagen yaitu sebesar 56,93%, dengan jenis asam amino dominan yaitu glisina dan diikuti oleh prolina. Komposisi asam amino antara kolagen dengan hidrolisatnya tidak jauh berbeda, karena analisis yang dilakukan adalah analisis asam amino total. Enzim alkalase menurut Nurilmala *et al.*, (2020) dapat menghidrolisis ikatan peptida protein yang memiliki asam amino alifatik atau aromatik misalnya leusina, fenilalanina, dan tirosina. Jenis enzim alkalase sebagai endonuklease dapat memfasilitasi proses pembentukan asam amino bebas dalam protein yang dihidrolisis sehingga dapat meningkatkan kandungan asam amino bebas (Ambigaipalan *et al.*, 2015).

Ultrasonikasi dapat berpengaruh terhadap nilai total asam amino pada suatu sampel. Hal tersebut diakibatkan oleh efek kavitas dari ultrasonikasi sehingga protein lebih mudah untuk terbuka. Efek kavitas akan menyebabkan komponen asam amino lebih banyak yang terpapar atau terekspos (Jiang *et al.*, 2014). Perlakuan ultrasonikasi juga dapat menyebabkan terjadinya degradasi parsial dari struktur sel internal bahan,



Gambar 1 Profil bobot molekul peptida; (a) kolagen larut pepsin; (b) hidrolisat kolagen (enzim alkalase (2:20) (enzim/mg protein); 2 jam sonikasi)

Tabel 2 Komposisi asam amino kolagen larut pepsin dan hidrolisatnya

Asam amino	g asam amino/100 g bahan	
	Kolagen larut pepsin (bk)	Hidrolisat kolagen (bk)
Glisina	13,73	14,97
L-Alanina	6,06	6,22
L-Arginina	4,45	5,08
L-Asam Aspartat	3,47	3,16
L-Asam Glutamat	6,50	6,25
L-Fenilalanina	1,34	1,34
L-Histidina	0,39	0,51
L-Isoleusina	0,83	0,86
L-Leusina	1,87	1,86
L-Lisina	2,27	2,49
L-Proлина	6,70	6,59
L-Serina	2,01	2,66
L-Threonina	2,97	2,80
L-Tirosina	0,28	0,25
L-Valina	1,41	1,89
Total (g/100 g)	54,26	56,93

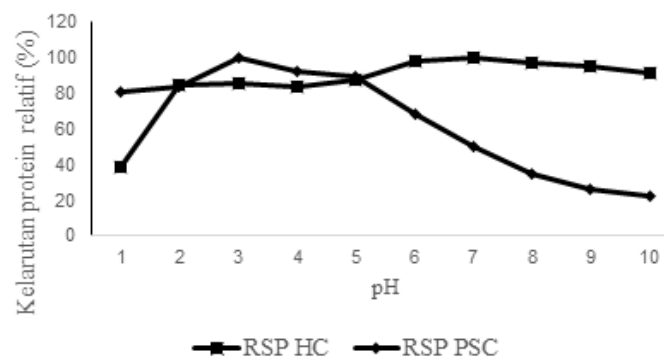
Keterangan: bk = basis kering; hidrolisat kolagen (enzim alkalase (2:20) (enzim/mg protein); 2 jam sonikasi). Nilai merupakan rata-rata dari dua ulangan dan diuji oleh laboratorium yang terakreditasi SNI/ISO 17025.

sehingga proses transfer massa selama ekstraksi asam amino dapat dilakukan dengan waktu yang lebih singkat jika dibandingkan dengan ekstraksi tanpa ultrasonikasi (Yang *et al.*, 2015).

Kelaurutan Protein Relatif Kolagen dan Hidrolisat Kolagen

Hasil analisis kelaurutan protein relatif

pada sampel kolagen dan hasil hidrolisisnya dapat dilihat pada Gambar 2. Hasil analisis menunjukkan bahwa kolagen memiliki kelaurutan protein relatif tertinggi pada nilai pH yang rendah yaitu pada pH 3 sebesar 100%, serta nilai konsentrasi terendah terdapat pada pH 10 yaitu 22%. Kolagen larut pepsin cenderung stabil kelaurutannya pada rentang



Gambar 2 Kelaurutan protein relatif kolagen larut pepsin (RSP PSC) dan hidrolisat kolagen (RSP HC); hidrolisat kolagen (enzim alkalase (2:20) (enzim/mg protein); 2 jam sonikasi)

pH rendah. Hidrolisat kolagen memiliki nilai kelarutan protein yang cukup stabil pada seluruh pH dengan kelarutan protein relatif terendah yaitu pada pH 1 sebesar 39% serta nilai tertinggi pada pH 7 yaitu 100%. Kelarutan protein relatif dari hidrolisat protein terlihat cukup stabil pada rentang pH 6-10.

Enzim alkalase yang digunakan untuk proses hidrolisis kolagen larut pepsin dapat berpengaruh terhadap peningkatan kadar protein serta kelarutan proteinnya. Hal tersebut berkorelasi pada proses pemotongan bobot molekul menjadi lebih rendah oleh enzim protease. Kelarutan protein suatu produk dapat meningkat sebagai akibat pengurangan ukuran fraksi molekul protein menjadi peptida (Khiari *et al.*, 2014). Selain itu, ultrasonikasi juga dapat berperan dalam peningkatan kelarutan protein yang disebabkan oleh adanya perubahan struktur protein. Struktur protein yang berubah akibat ultrasonikasi akan berdampak pada hidrofobisitas permukaan, gugus sulfhidril bebas serta ikatan disulfida (Yang *et al.*, 2018). Penggunaan ultrasonikasi pada proses ekstraksi dapat membuka struktur protein serta dapat memperluas permukaan kontak antara asam amino hidrofilik dengan molekul air. Hal tersebut yang menyebabkan kelarutan protein menjadi lebih tinggi (Han *et al.*, 2020).

Karakteristik Fisikokimia Kolagen dan Hidrolisat Kolagen

Analisis terhadap beberapa karakteristik fisikokimia dan kapasitas antioksidan pada sampel kolagen dan hidrolisatnya dapat dilihat pada Tabel 3. Kolagen larut pepsin memiliki nilai pH sebesar 3,15 sedangkan hidrolisat kolagen memiliki nilai pH sebesar 6,94.

Nilai pH akan berpengaruh terhadap sifat fungsional dari bahan contohnya kelarutan. Kolagen larut pepsin dapat memiliki kelarutan yang optimum pada pH asam, sedangkan hidrolisat kolagen cenderung memiliki kelarutan yang stabil pada semua rentang pH. Hidrolisat kolagen dengan pH netral cenderung dapat dikomersialisasikan lebih baik karena dapat diaplikasikan pada bahan pangan dan non-pangan (Umi *et al.*, 2019). Kelarutan pada sampel kolagen memiliki nilai sebesar 77,4%, sedangkan hidrolisat kolagen sebesar 99,54%. Kelarutan bahan dengan air menurut Khiari *et al.*, (2014) akan dipengaruhi oleh bobot molekul yang rendah yang terdapat pada sampel. Bobot molekul rendah dapat berkorelasi dengan peningkatan paparan residu asam amino yang bersifat polar sehingga dapat mengikat air melalui ikatan hidrogen.

Daya serap air pada sampel kolagen larut pepsin yang diperoleh pada penelitian ini yaitu sebesar 5,86 mL/g, sedangkan pada hidrolisat tidak dilakukan analisis ini. Hidrolisat kolagen tidak dapat menyerap air dan cenderung akan larut secara sempurna pada media air. Nilai daya serap minyak yang didapat pada kolagen larut pepsin pada penelitian ini mencapai 3,15 mL/g, sedangkan pada hidrolisat mencapai 1,19 mL/g. Daya serap minyak dapat terkait pada residu asam amino non-polarnya. Interaksi hidrofobik antara asam amino non-polar dari molekul protein serta rantai hidrokarbon minyak sangat berpengaruh terhadap nilai daya serap minyak (Kusnandar, 2010). Proses ultrasonikasi dalam proses hidrolisis kolagen dapat memengaruhi hidrofobisitas permukaan asam amino dari hidrolisat kolagen, sehingga hal tersebut

Tabel 3 Karakteristik fisikokimia dari kolagen larut pepsin dan hidrolisat kolagen

Parameter	Kolagen	Hidrolisat kolagen
pH	3,15±0,08 ^b	6,94±0,14 ^a
Kelarutan bahan (%)	77,44±0,60 ^b	99,54±0,1 ^a
Daya serap air (mL/g)	5,86±0,09	-
Daya serap minyak (mL/g)	3,15±0,04 ^a	1,19±0,01 ^b

Keterangan: nilai rata-rata kolom dan baris yang diikuti huruf berbeda menunjukkan berbeda nyata ($p < 0,05$). Hidrolisat kolagen (enzim alkalase (2:20) (enzim/mg protein); 2 jam sonikasi)

mengakibatkan terjadinya penurunan daya serap minyak.

Kapasitas Antioksidan Kolagen dan Hidrolisat Kolagen

Kapasitas antioksidan dari kolagen larut pepsin dan hidrolisat kolagen dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4 Kapasitas antioksidan kolagen larut pepsin dan hidrolisat kolagen

Parameter	DPPH IC ₅₀ (mg/L)	ABTS IC ₅₀ (mg/L)
Kolagen larut pepsin	423,1 ^a	272,10 ^b
Hidrolisat kolagen	77,2 ^a	40,72 ^b
Asam askorbat	4,31 ^a	3,58 ^b

Keterangan: nilai rata-rata kolom dan baris yang diikuti huruf berbeda menunjukkan berbeda nyata ($p < 0,05$). Hidrolisat kolagen (enzim alkalase (2:20) (enzim/mg protein); 2 jam sonikasi)

Sampel kolagen larut pepsin memiliki kapasitas antioksidan DPPH dengan nilai IC₅₀ sebesar 423,1 mg protein/L, sedangkan pada hidrolisat memiliki nilai IC₅₀ mencapai 77,2 mg protein/L. Sedangkan pada kapasitas antioksidan metode ABTS kolagen larut pepsin dan hidrolisat pada penelitian ini memiliki nilai berturut turut sebesar 272,1 mg protein/L dan 40,72 mg protein/L. Karakteristik kapasitas antioksidan dari kolagen dan hidrolisatnya pada penelitian ini sangat jauh berbeda. Hal tersebut dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor, salah satunya adalah perbedaan bobot molekul. Bobot molekul yang rendah dari peptida cenderung menunjukkan aktivitas biologis misalnya antioksidan yang tinggi (Ketnawa *et al.*, 2016). Aktivitas antioksidan yang tinggi umumnya ditemukan pada produk dengan bobot molekul rendah dengan rantai oligopeptida terputus. Selain itu, faktor lain misalnya spesifitas enzim protease yang digunakan pada proses hidrolisis juga dapat berpengaruh terhadap ukuran, jumlah, dan urutan asam aminonya. Hal tersebut yang kemudian dapat berpengaruh terhadap aktivitas antioksidan dari produk hidrolisat yang dihasilkan (Mosquera *et al.*, 2016). Ultrasonikasi juga dapat berpengaruh terhadap peningkatan aktivitas antioksidan dari produk hidrolisat. Perlakuan ultrasonikasi dapat memengaruhi

molekul protein, sehingga bagian dari situs interaksi gugus asam amino hidrofobik dapat terpapar. Selanjutnya, sonikasi juga dapat meningkatkan luas area permukaan kontak bahan yaitu substrat dengan enzim saat proses hidrolisis sehingga aktivitas antioksidan dapat meningkat. Hidrolisis enzimatik protein yang

dikombinasikan dengan ultrasonikasi dapat memiliki manfaat untuk memperoleh peptida aktif dan efektif (Zhao *et al.*, 2021).

KESIMPULAN

Produksi hidrolisat kolagen dapat menggunakan metode hidrolisis dengan menggunakan enzim alkalase dan metode fisik yaitu ultrasonikasi. Hidrolisat kolagen dengan nilai derajat hidrolisis, serta aktivitas penghambatan antioksidan metode DPPH dan ABTS tertinggi diperoleh pada perlakuan penambahan enzim Alkalase[®] sebanyak 2:20 (enzim/mg protein) dengan waktu hidrolisis selama dua jam menggunakan metode ultrasonikasi. Karakteristik fisikokimia dari produk hidrolisat kolagen jauh lebih baik jika dibandingkan dengan bentuk utuh kolagen, di antaranya yaitu bobot molekul yang lebih rendah, serta total asam amino, kelarutan protein relatif, kelarutan bahan dalam air, dan kapasitas penghambatan antioksidan yang lebih tinggi lima kali lipat untuk metode DPPH dan tujuh kali lipat lebih kuat untuk metode ABTS.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih diucapkan kepada Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan Fakultas Teknologi Pertanian, dan Departemen Teknologi Hasil Perairan

Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Insitut Pertanian Bogor yang telah memfasilitasi terlaksananya penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Association of Official Analytical Chemists. (2012). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. AOAC.
- Adeleke, R. O., & Odedeji, J. O. (2010). Functional properties of wheat and sweet potato flour blends. *Pakistan Journal of Nutrition*, 9(6), 535–538. <https://doi.org/10.3923/PJN.2010.535.538>
- Akram, A. N., & Zhang, C. (2019). Effect of ultrasonication on the yield, functional and physicochemical characteristics of collagen-II from chicken sternal cartilage. *Food Chemistry*, 307, 125544–125544. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2019.125544>
- Ali, A. M. M., Kishimura, H., & Benjakul, S. (2018). Extraction efficiency and characteristics of acid and pepsin soluble collagens from the skin of golden carp (*Probarbus jullieni*) as affected by ultrasonication. *Process Biochemistry*, 66, 237–244. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2018.01.003>
- Ambigaipalan, P., Al-Khalifa, A. S., & Shahidi, F. (2015). Antioxidant and angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activities of date seed protein hydrolysates prepared using Alcalase, Flavourzyme and Thermolysin. *Journal of Functional Foods*, 18, 1125–1137. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2015.01.021>
- Apriyantono, A., Ferdiaz, D., Puspitasari, N., Sedarnawati, & Budiyanto, S. (1985). Analisis Pangan. PAU Pangan dan Gizi, Institut Pertanian Bogor.
- Araujo, J., Sica, P., Costa, C., & Márquez, M. C. (2021). Enzymatic hydrolysis of fish waste as an alternative to produce high value-added products. *Waste and Biomass Valorization*, 12(2), 847–855. <https://doi.org/10.1007/S12649-020-01029-X>
- Benjakul, S., Karnjanapratum, S., & Visessanguan, W. (2018). Production and characterization of odorless antioxidative hydrolyzed collagen from seabass (*Lates calcarifer*) skin without descaling. *Waste and Biomass Valorization*, 9(4), 549–559. <https://doi.org/10.1007/S12649-017-0008-9>
- Blanco, M., Vázquez, J. A., Pérez-Martín, R. I., & Sotelo, C. G. (2017). Hydrolysates of fish skin collagen: An opportunity for valorizing fish industry byproducts. *Marine Drugs*, 15(5). <https://doi.org/10.3390/MD15050131>
- Davison-Kotler, E., Marshall, W. S., & García-Gareta, E. (2019). Sources of collagen for biomaterials in skin wound healing. *Bioengineering*, 6(3). <https://doi.org/10.3390/BIOENGINEERING6030056>
- Guerra-Almonacid, C. M., Torruco-Uco, J. G., Murillo-Arango, W., Méndez-Arteaga, J. J., & Rodríguez-Miranda, J. (2019). Effect of ultrasound pretreatment on the antioxidant capacity and antihypertensive activity of bioactive peptides obtained from the protein hydrolysates of *Erythrina edulis*. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 31(4), 288–296. <https://doi.org/10.9755/EJFA.2019.V31.I4.1938>
- Han, T., Wang, M., Wang, Y., & Tang, L. (2020). Effects of high-pressure homogenization and ultrasonic treatment on the structure and characteristics of casein. *LWT*, 130, 109560. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2020.109560>
- Haslaniza, H., Maskat, M. Y., Wan Aida, W. M., & Mamot, S. (2010). The effects of enzyme concentration, temperature and incubation time on nitrogen content and degree of hydrolysis of protein precipitate from cockle (*Anadara granosa*) meat wash water. *International Food Research Journal*, 17(1), 147–152.
- Ibrahim, E. S. K., & Ghani, M. A. (2020). The effect of enzymatic hydrolysis on the antioxidant activities and amino acid profiles of defatted chia (*Salvia hispanica* L.) flour. *Food Research*, 4, 38–50. [https://doi.org/10.26656/FR.2017.4\(S4\).003](https://doi.org/10.26656/FR.2017.4(S4).003)
- Jiang, L., Wang, J., Li, Y., Wang, Z., Liang, J., Wang, R., Chen, Y., Ma, W., Qi, B., & Zhang, M. (2014). Effects of ultrasound on the structure and physical properties of black bean protein isolates. *Food Research*

- International*, 62, 595–601. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2014.04.022>
- Jongjareonrak, A., Benjakul, S., Visessanguan, W., Nagai, T., & Tanaka, M. (2005). Isolation and characterisation of acid and pepsin-solubilised collagens from the skin of Brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*). *Food Chemistry*, 93(3), 475–484. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2004.10.026>
- Jridi, M., Lassoued, I., Nasri, R., Ayadi, M. A., Nasri, M., & Souissi, N. (2014). Characterization and potential use of cuttlefish skin gelatin hydrolysates prepared by different microbial proteases. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/461728>
- Kementerian Kelautan dan Perikanan. (2018). Profil Peluang Investasi Komoditas Tuna, Laporan Tahunan 2018.
- Ketnawa, S., Martínez-Alvarez, O., Benjakul, S., & Rawdkuen, S. (2016). Gelatin hydrolysates from farmed Giant catfish skin using alkaline proteases and its antioxidative function of simulated gastro-intestinal digestion. *Food Chemistry*, 192, 34–42. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2015.06.087>
- Khiari, Z., Ndagijimana, M., & Betti, M. (2014). Low molecular weight bioactive peptides derived from the enzymatic hydrolysis of collagen after isoelectric solubilization/precipitation process of turkey by-products. *Poultry Science*, 93(9), 2347–2362. <https://doi.org/10.3382/PS.2014-03953>
- Kusnandar, F. (2010). Kimia Pangan : Komponen Makro. Dian Rakyat.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680A0>
- Li, Z. R., Wang, B., Chi, C. feng, Zhang, Q. H., Gong, Y. dan, Tang, J. J., Luo, H. yu, & Ding, G. fang. (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(1), 103–113. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2012.10.001>
- Liu, D., Liang, L., Regenstein, J. M., & 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(4), 1441–1448. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2012.02.032>
- Liu, Liu, C.-E., Lorena, D., Zhang, X., & Fu, Z. (2012). Evaluation of the antioxidant activity of collagen peptide additive extracted from cod skin. *Journal of Environmental Protection and Ecology*, 13(3A), 1836–1841.
- Mosquera, M., Giménez, B., Ramos, S., López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. del C., & Montero, P. (2016). Antioxidant, ACE-inhibitory, and antimicrobial activities of peptide fractions obtained from dried giant squid tunics. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 25(3), 444–455. <https://doi.org/10.1080/10498850.2013.819543>
- Nantitanon, W., Chowwanapoonpohn, S., & Okonogi, S. (2007). Antioxidant and antimicrobial activities of *Hyptis suaveolens* essential oil. *Scientia Pharmaceutica*, 75(1), 35–54. <https://doi.org/10.3797/SCIPHARM.2007.75.35>
- Nilsuwan, K., Fusang, K., Pripatnanont, P., & Benjakul, S. (2022). Properties and characteristics of acid-soluble collagen from salmon skin defatted with the aid of ultrasonication. *Fishes 2022*, Vol. 7, Page 51, 7(1), 51. <https://doi.org/10.3390/FISHES7010051>
- Nurhayati, T., Nurjanah., Abdullah A., & Baharuddin T, I. (2021). Metode Ekstraksi Kolagen dari Kulit Ikan menggunakan Enzim Pepsin dari Lambung Ikan. [paten]. Kementerian Hukum dan Hak Asasi Manusia Republik Indonesia.
- Nurilmala, M., Hizbullah, H. H., Karnia, E., Kusumaningtyas, E., & Ochiai, Y. (2020). Characterization and Antioxidant Activity of Collagen, Gelatin, and the Derived Peptides from Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*) Skin. *Marine Drugs* 2020, Vol. 18, Page 98, 18(2), 98. <https://doi.org/10.3390/MD18020098>

- Nurjanah, Baharuddin, T. I., & 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. <https://doi.org/10.17844/JPHPI.V24I2.35410>
- Pham, A., Ky, X., Vy, B., Ha, V., Khanh Hy, H., Hong, T., Thiet, T., Anh, P., Xuan Ky, P., Bao Vy, P., Viet Ha, D., Ho Khanh Hy, L., Thu Hong, N., Thi Thiet, D., & Phuong Anh, N. (2018). Investigation of protein patterns and antioxidant activity of collagen hydrolysates from skin of Fan-bellied leatherjacket *Monacanthus chinensis* by various enzymes. *Journal of Marine Science and Technology*, 18(4A), 141–150. <https://doi.org/10.15625/1859-3097/18/4A/13642>
- Sae-leaw, T., & Benjakul, S. (2018). Antioxidant activities of hydrolysed collagen from salmon scale ossein prepared with the aid of ultrasound. *International Journal of Food Science & Technology*, 53(12), 2786–2795. <https://doi.org/10.1111/IJFS.13891>
- Schmidt, M. M., Dornelles, R. C. P., Mello, R. O., Kubota, E. H., Mazutti, M. A., Kempka, A. P., & Demiate, I. M. (2016). Collagen extraction process. *International Food Research Journal*, 23(3), 913–922.
- Shon, J., Eun, J. B., Eo, J. H., & Hwang, S. J. (2011). Effect of processing conditions on functional properties of collagen powder from skate (*Raja kenoei*) skins. *Food Science and Biotechnology*, 20(1), 99–106. <https://doi.org/10.1007/S10068-011-0014-9>
- Umi, H., Qhairul, A., Nor Qhirul, I., & Hasmadi, M. (2019). Properties of hydrolysed collagen from the skin of milkfish (*Chanos chanos*) as affected by different enzymatic treatments. *International Journal of Research Science & Management*, 6(2), 34–41. <https://doi.org/10.5281/ZENODO.2572454>
- Vidal, A. R., Cansian, R. L., Mello, R. de O., Kubota, E. H., Demiate, I. M., Zielinski, A. A. F., & Dornelles, R. C. P. (2019). Effect of ultrasound on the functional and structural properties of hydrolysates of different bovine collagens. *Food Science and Technology*, 40(2), 346–353. <https://doi.org/10.1590/FST.00319>
- Wang, B., Wang, Y. M., Chi, C. F., Luo, H. Y., Deng, S. G., & Ma, J. Y. (2013). Isolation and characterization of collagen and antioxidant collagen peptides from scales of croceine croaker (*Pseudosciaena crocea*). *Marine Drugs*, 11(11), 4641–4661. <https://doi.org/10.3390/MD11114641>
- Yang, H., Gao, J., Yang, A., & Chen, H. (2015). The ultrasound-treated soybean seeds improve edibility and nutritional quality of soybean sprouts. *Food Research International*, 77, 704–710. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2015.01.011>
- Yang, X., Li, Y., Li, S., Oladejo, A. O., Wang, Y., Huang, S., Zhou, C., Ye, X., Ma, H., & Duan, Y. (2018). Effects of ultrasound-assisted α -amylase degradation treatment with multiple modes on the extraction of rice protein. *Ultrasonics Sonochemistry*, 40, 890–899. <https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2017.08.028>
- Zhao, F., Zhai, X., Liu, X., Lian, M., Liang, G., Cui, J., Dong, H., & Wang, W. (2021). Effects of high-intensity ultrasound pretreatment on structure, properties, and enzymolysis of walnut protein isolate. *Molecules* 2022, Vol. 27, Page 208, 27(1), 208. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES27010208>

FIGURE AND TABLE TITLES

Figure 1 Molecular weight profile of peptide

Figure 2 Relative protein solubility pepsin soluble collagen (RPS PSC) and collagen hydrolysate (RSP HC)

Table 1 Value of degree of hydrolysis (DH) and radical inhibition (DPPH and ABTS) of collagen hydrolysate from different alcalase concentration and sonication duration

Table 2 Amino acid composition of pepsin soluble collagen and its hydrolysate

Table 3 Physicochemical properties of pepsin soluble collagen and collagen hydrolysate

Table 4 Antioxidant capacity of pepsin soluble collagen and collagen hydrolysate