

## PROFILING KOLAGEN GELEMBUNG RENANG IKAN PATIN (*Pangasius sp.*) MELALUI PROSES ENZIMATIS

Gevbry Ranti Ramadhani Simamora<sup>1\*</sup>, Wini Trilaksani<sup>1</sup>, Uju<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Departemen Teknologi Hasil Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan,

<sup>2</sup>Surfactant and Bioenergy Research Center (SBRC), Institut Pertanian Bogor Institut Pertanian Bogor  
Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Dramaga, Jalan Agatis, Bogor 16680 Jawa Barat

Telepon (0251) 8622909-8622906, Faks. (0251) 8622915

\*Korespondensi: gevbryrantirs@gmail.com

Diterima: 31 Mei 2019/ Disetujui: 19 Juli 2019

**Cara sitasi:** Simamora GRR, Trilaksani W, Uju. 2019. *Profiling kolagen gelembung renang ikan patin (Pangasius sp.)* melalui proses enzimatis. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 22(2): 299-310.

### Abstrak

Gelembung renang merupakan salah satu *by product* hasil perairan yang berpotensi sebagai sumber alternatif kolagen terbarukan yang sangat dibutuhkan oleh industri makanan, kosmetik, biomedis dan farmasi. Penelitian ini bertujuan mengevaluasi efektivitas praperlakuan alkali dan penggunaan enzim papain terhadap karakteristik kolagen dari gelembung renang ikan patin. Metode penelitian ini yaitu praperlakuan alkali dengan konsentrasi 0,05; 0,1; dan 0,15 selama 2; 4; 6; 8; 10 dan 12 jam, konsentrasi enzim papain yang digunakan 0; 5.000; 10.000; 15.000 dan 20.000 U/mg dengan lama perendaman 24 dan 48 jam. Hasil penelitian menunjukkan bahwa *pretreatment* menggunakan NaOH 0,05 M dengan lama perendaman 6 jam memberikan pengaruh nyata terhadap eliminasi protein nonkolagen ( $p < 0,05$ ), sedangkan ekstraksi menggunakan enzim papain dengan konsentrasi 5.000 U/mg selama 48 jam berpengaruh signifikan terhadap tingkat kelarutan kolagen. Spektra FTIR kolagen memperlihatkan adanya struktur triple helix yang merupakan ciri khas kolagen. Analisis termal menunjukkan suhu transisi gelasi ( $T_g$ ) 88°C.

Kata kunci: alkali, enzim papain, gugus fungsi, *pretreatment*

### *Profiling of Catfish Swim Bladder Collagen (Pangasius sp.) Through Enzymatic Proses*

#### Abstract

Swim bladder is a marine byproduct and a potential source of collagen needed by food, cosmeutical, biomedical and pharmaceutical industry. This study evaluated the effectiveness of alkaline pretreatment and papain enzyme on the characteristics of collagen from the catfish swim bladders. Three concentrations of alkaline (0.05; 0.1 and 0.15 M) with were used to pretreat the swim bladders for 2; 4; 6; 8; 10 and 12 hours. The collagen was also treated by papain enzyme with concentrations of 0; 5,000; 10,000; 15,000 and 20,000 U/mg for 24 and 48 hours. The result showed that pretreatment using NaOH 0.05 M for 6 hours effectively reduced the noncollagen protein ( $p < 0.05$ ). Meanwhile, the treatment using papain enzyme with concentration of 5.000 U/mg for 48 hours improved the collagen solubility. The FTIR of collagen showed the existence of a triple helix structure. Meanwhile, the thermal analysis showed collagen gelation transition temperature ( $T_g$ ) was at 88°C.

Keywords: alkaline, papain enzyme, fungsional group, pretreatment

### PENDAHULUAN

Kolagen adalah protein struktural utama jaringan ikat yang mencapai 30% dari total protein tubuh dan merupakan penyusun komponen tulang, gigi, otot, dan kulit (Potaros *et al.* 2009). Senyawa ini memiliki *triple helix* yang tersusun atas tiga rantai  $\alpha$  polipeptida dan merupakan protein berserat (Alberts *et al.* 2002). Kolagen

pada perkembangannya telah menjadi biomaterial penting dalam bidang industri, kosmetik, maknan, biomedis, dan farmasi (Duan *et al.* 2009). Sumber utama kolagen komersial umumnya berasal dari hewan terestrial misalnya sapi dan babi, akan tetapi penggunaan sapi mulai menimbulkan kekhawatiran dikalangan produsen dan konsumen karena merebaknya penyakit prion

*bovine spongiform encephalopathy* (BSE) dan *foot and mouth disease* (FMD) serta adanya permasalahan menyangkut agama yang tidak memperbolehkan penggunaan babi dan sapi sebagai sumber kolagen (Guillen *et al.* 2002). Kondisi tersebut membuka peluang penggunaan sumber kolagen selain dari hewan terestrial yakni hewan akuatik, salah satunya ikan. Ikan dapat digunakan sebagai sumber alternatif kolagen karena tidak mungkin dikaitkan dengan penyakit prion, FMD ataupun kehalalan. Kolagen yang bersumber dari ikan memiliki keunggulan dibandingkan hewan terestrial dilihat dari sisi serat protein yang lebih pendek (Muyonga *et al.* 2004<sup>a</sup>; Liu *et al.* 2012) dan struktur molekul yang lebih sederhana sehingga mudah untuk diserap (Kumar *et al.* 2011). Hampir semua jenis ikan dapat digunakan sebagai sumber kolagen tetapi akan lebih efektif bila memanfaatkan bahan hasil samping industri patin yang melimpah.

Ikan patin adalah salah satu komoditas ekspor yang bernilai ekonomis tinggi dalam bentuk *fillet*. Usaha *fillet* ikan patin mulai berkembang seiring dengan permintaan pasar domestik dan internasional. (Laheng *et al.* 2016). Produksi ikan patin di Indonesia pada tahun 2016 mencapai 437.111 ton, meningkat signifikan dari tahun sebelumnya yaitu 339.069 ton. Tahun 2018 produksi ikan patin mencapai 604.587 ton (KKP 2018). Peningkatan produksi ikan patin menyebabkan terjadinya peningkatan hasil samping ikan patin yang terdiri dari kulit, kepala, tulang, dan gelembung renang. *Byproduct* yang dihasilkan pada saat pengolahan ikan berkisar 20-60% dari total bahan baku. Gelembung renang ikan memiliki proporsi kurang dari 2% dalam satu ekor ikan dengan kandungan protein kolagen yang tinggi yakni 93,39% bk (Kartika *et al.* 2016).

Gelembung renang merupakan salah satu organ pada ikan yang berfungsi menjaga keseimbangan tubuh di dalam air (Kaewdang 2015). Perut ikan, *lupe* atau *katak* merupakan istilah komersial gelembung renang di Indonesia. Gelembung renang dikelompokkan kedalam jenis jeroan (Kartika 2017). Penelitian terkait gelembung renang di Indonesia telah dilakukan sejak tahun 2006 yaitu

gelembung renang ikan patin ditransformasi menjadi *edible film*; *isinglass* (Riyanto 2006; Trilaksana *et al.* 2006) dan gelembung renang ikan cunang ditransformasi menjadi kolagen (Djailani *et al.* 2016; Kartika *et al.* 2016; Gadi *et al.* 2017). Liu *et al.* (2012) melaporkan bahwa gelembung renang dapat diekstrak menjadi kolagen dengan rendemen mendekati hasil ekstraksi dari kulit, sisik dan tulang ikan. Gelembung renang ikan yang telah berhasil diekstrak menjadi kolagen yaitu gembung renang ikan gurijuba (*Arius parkeri*); *bighead carp* (*Hypophthalmichthys nobilis*); *seabass* (*Lates calcarifer*); cunang (*M. talabon*); *Miiuy Croaker* (*Miichthys miiuy*) (Fernandes *et al.* 2008; Liu *et al.* 2012; Sinthusamran *et al.* 2013; Kartika *et al.* 2016; Zhao *et al.* 2018).

Prinsip dasar dalam mengekstrak kolagen diawali dengan *pretreatment* menggunakan alkali. Ekstraksi kolagen dapat dilakukan dengan beberapa metode, namun metode asam (*acid solubilized collagen/ASC*) masih mendominasi karena cukup mudah dilakukan. Selain metode asam, ekstrak kolagen juga menggunakan enzim. Enzim yang biasa digunakan untuk mengekstrak kolagen adalah enzim pepsin, tetapi penggunaan enzim pepsin ini memiliki kekurangan dari segi kehalalan karena bersumber dari babi sehingga penggunaan selain enzim pepsin telah digunakan yaitu enzim papain (Wong 1989). Selain itu, penggunaan enzim papain lebih ekonomis, lebih mudah untuk diisolasi dan mudah didapatkan dibandingkan dengan enzim pepsin. Penggunaan enzim papain mulai berkembang pesat karena enzim tersebut mampu memecah serat-serat kolagen menjadi lebih sederhana dan rendemen yang dihasilkan dalam jumlah yang tinggi. Jamilah *et al.* (2013) melaporkan bahwa enzim papain dapat mengekstrak kolagen dari kulit ikan kakap putih (*Lates calcarifer*) yang menghasilkan rendemen lebih tinggi dibandingkan menggunakan enzim pepsin dan asam. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi pengaruh konsentrasi NaOH dalam pelarutan protein nonkolagen dan konsentrasi enzim papain terhadap karakteristik kolagen yang dihasilkan.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan dan Alat

Bahan baku utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah gelembung renang ikan patin yang diperoleh dari PT. Kurnia Mitra Makmur Purwakarta, Jawa Barat. Bahan kimia yang digunakan yaitu enzim papain (EC 3.4.22.2) dengan aktivitas 30.000 USP-U/mg (Merck KGaA, Germany), NaOH (Merck, Germany), CH<sub>3</sub>COOH (Merck, Germany), NaCl (Merck, Germany), akuades dan bahan analisa lainnya. Alat yang digunakan yaitu neraca digital Satorius® (ketelitian 0,001 g), spektrofotometer (DR 5000, Düsseldorf, Germany), *sentrifuge* (Sorvall LYNX 6000 Superspeed, Hitachi Koki, Japan), *freeze dryer* (Eyela FDU1200 Tokyo, Japan), *incubator* (Eyela®Tokyo Rikakikai, Japan), *magnetic stirrer* dengan *hotplate* (Yamato Scientific, Japan), *fourier transform infrared/FTIR* (Bruker Tensor 37, Ettlingen, Germany), *differential scanning calorimetry* (DSC-60 Shimadzu, Kyoto, Germany).

### Metode Penelitian

Penelitian dilakukan dalam empat tahap yaitu preparasi dan karakterisasi gelembung renang ikan patin berupa analisis komposisi proksimat dan asam amino; *pretreatment* menggunakan NaOH; ekstraksi kolagen menggunakan enzim papain; karakterisasi kolagen meliputi analisis gugus fungsi dan stabilitas termal.

### Preparasi dan karakterisasi gelembung renang ikan patin

Gelembung renang segar diperoleh dari hasil samping pengolahan industri *fillet* patin dengan ukuran ikan patin  $\pm 1$  kg/ekor ditransportasikan ke laboratorium menggunakan *styrofoam* yang berisi es agar selama perjalanan kesegaran gelembung renang ikan patin masih terjaga. Gelembung renang dicuci dengan air mengalir hingga bersih dan dilakukan pengecilan ukuran 0,5x0,5 cm<sup>2</sup> dengan tujuan untuk meluaskan permukaan sehingga mempermudah tahapan *pretreatment* dan ekstraksi. Gelembung renang yang akan digunakan dianalisis komposisi proksimat (AOAC 2005) dan asam amino (Nollet 1996).

### Pretreatment

*Pretreatment* mengacu pada metode Liu *et al.* (2015) dengan modifikasi. Protein nonkolagen, lemak, mineral, dan pigmen dieliminasi melalui perendaman gelembung renang ikan patin dalam NaOH konsentrasi 0,05; 0,1 dan 0,15 M dengan rasio sampel : larutan (1:10 b/v) pada suhu 4°C selama 12 jam dengan pergantian larutan NaOH setiap 2 jam. Larutan NaOH sisa perendaman gelembung renang di uji kandungan protein nonkolagennya secara kuantitatif menggunakan metode Bradford dan BSA sebagai standar untuk menentukan konsentrasi dan lama perendaman terpilih.

### Ekstraksi kolagen dengan modifikasi proses ekstraksi (*Papain Soluble Collagen/PaSC*)

Ekstraksi kolagen mengacu pada (Jamilah *et al.* 2013). Gelembung renang hasil *pretreatment* terpilih dicuci hingga mencapai pH netral, lalu dilakukan perendaman menggunakan asam asetat dengan konsentrasi 0,5 M (rasio 1:10 b/v), kemudian penambahan enzim papain pada konsentrasi 0; 5.000; 10.000; 15.000; 20.000 U/mg jam menggunakan suhu 4°C selama 24 dan 48 jam, lalu dilakukan penyaringan. Filtrat yang dihasilkan dipresipitasi dengan NaCl konsentrasi 2,6 M selama 12 jam. Presipitat dipisahkan dengan sentrifugasi dingin (4°C) pada kecepatan 10.000 g selama 30 menit. Pelet yang dihasilkan dilarutkan ke dalam 0,5 M asam asetat (1:1 b/v) dan didialisis menggunakan kantong dialisis 12 kDa terhadap 0,1 M asam asetat dan akuades (rasio 1:10; b/v) masing-masing selama 24 jam sampai pH netral, kemudian dilakukan proses liofilisasi (*freeze drying*) untuk memperoleh kolagen dalam bentuk kering. Parameter yang diuji pada tahap ekstraksi kolagen ini adalah tingkat kelarutan kolagen untuk menentukan perlakuan terpilih.

### Karakterisasi fisikokimia kolagen

Karakterisasi kolagen yang dilakukan meliputi analisis kelarutan kolagen (Kittiphattanabawon *et al.* 2005), gugus fungsi dan stabilitas thermal (Rochdi *et al.* 2000).

## Analisis Data

Analisis yang digunakan pada uji komposisi proksimat dan asam amino ini adalah analisis secara deskriptif yang ditunjukkan dalam hasil berupa tabel dan grafik. Rancangan percobaan yang digunakan pada *pretreatment* menggunakan NaOH konsentrasi (0,05 M; 0,1 M dan 0,15 M) selama 12 jam dan ekstraksi dengan enzim papain konsentrasi (0; 5.000; 1.0000; 15.000 dan 20.000 U/mg) selama 24 dan 48 menggunakan rancangan acak lengkap faktorial RALF). Data hasil penelitian dianalisis dengan analisis ragam (ANOVA) menggunakan perangkat lunak SAS 9,4 dan apabila ada beda nyata maka dilanjutkan dengan uji lanjut *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf kepercayaan 95% (Steel dan Torrie 1993).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Komposisi Proksimat Gelembung Renang Ikan Patin

Pengujian komposisi proksimat bahan baku bertujuan untuk mengetahui kandungan gizi guna menilai kelayakan mutu gelembung renang ikan patin sebagai bahan baku dalam menghasilkan kolagen. Karakteristik kimia gelembung renang ikan patin dapat dilihat pada *Table 1*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar protein memiliki nilai yang lebih tinggi dibandingkan komposisi lainnya. Kandungan protein gelembung renang ikan patin lebih rendah dibandingkan dengan protein gelembung renang cunang (Djailani 2016), tetapi lebih tinggi dibandingkan gelembung renang

tuna sirip kuning hasil penelitian Kaewdang *et al.* (2014) dan Idrus *et al.* (2018). Riyanto (2006) menyatakan bahwa gelembung renang mempunyai komposisi protein yang sebagian besar didominasi oleh protein kolagen.

Komposisi tertinggi berikutnya selain protein ialah air. Kadar air gelembung renang ikan patin relatif lebih tinggi dari gelembung renang cunang (Djailani 2016) dan gelembung renang patin (Yanuardi 2006), akan tetapi lebih rendah dari gelembung renang tuna sirip kuning (Kaewdang *et al.* 2014; Idrus *et al.* 2018). Chen *et al.* (2016) menjelaskan bahwa kadar air berfungsi dalam menjaga kelenturan dan tekstur gelembung renang, serta berperan dalam penyeimbang pH. Jumlah molekul air pada gelembung renang akan mempengaruhi persentase kadar protein, lemak, dan abu sehingga apabila terjadi fluktuasi kadar air selama proses pengolahan, penyimpanan dan pengeringan jaringan maka akan mengubah komposisi biokimia yang lainnya.

Kadar lemak gelembung renang ikan patin lebih rendah bila dibandingkan dengan ikan cunang (Djailani 2016) dan ikan tuna sirip kuning (Kaewdang *et al.* 2014; Idrus *et al.* 2018) tetapi lebih tinggi dibandingkan gelembung renang ikan patin hasil penelitian Yanuardi (2006). Kadar abu merupakan analisis untuk menunjukkan total mineral dalam suatu bahan pangan. Kadar abu gelembung renang ikan patin lebih tinggi dibandingkan kadar abu ikan cunang (Djailani 2016) dan tuna sirip kuning (Kaewdang *et al.* 2014). Kadar lemak dan abu pada proses ekstraksi kolagen

Table 1 Proximate composition swim bladder of catfish several other types of fish

Parameter	Percentage (%)				
	Catfish <sup>1</sup>	<i>Congresox talabon</i> <sup>2</sup>	Yellowfin tuna <sup>3</sup>	Yellowfin tuna <sup>4</sup>	Catfish <sup>5</sup>
Protein	21.47±0.47	24.74±0.75	20.27	12.09	25.67
Protein **	84.66±0.47	94.71±0.75	85.31	72.52	98.84
Ash	0.51±0.05	0.27±0.03	1.24	0.29	0.08
Lipid	0.42±0.02	0.50±0.05	3.17	1.44	0.03
Moisture	74.64±0.91	73.88±0.22	76.24	83.33	74.03

*Information:* <sup>1</sup>research data, <sup>2</sup>Djailani (2016), <sup>3</sup>Idrus *et al.* (2018), <sup>4</sup>Kaewdang *et al.* (2014), <sup>5</sup>Yanuardi (2006). \*\* dry base (db)

gelembung renang perlu untuk dihilangkan melalui *pretreatment* guna mendapatkan produk kolagen yang sesuai dengan standar.

### Komposisi Asam Amino Gelembung Renang Ikan Patin

Asam amino dapat menentukan kualitas suatu produk yang berbasis protein. Komposisi asam amino gelembung renang patin dapat dilihat pada *Figure 1*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa gelembung renang ikan patin mengandung tiga asam amino tertinggi yaitu glisina 55,94 mg/g, prolina 30,48 mg/g, dan alanina 23,40 mg/g. Komposisi asam amino gelembung renang tersebut didominasi oleh asam amino penciri protein kolagen. Bae *et al.* (2008) menegaskan asam amino yang ditemukan di dalam kolagen didominasi oleh jenis asam amino glisina, alanina, prolina dan hidroksiprolina. Komposisi asam amino glisina, alanina dan prolina yang tinggi serta asam amino histidina dan tirosina yang rendah mengindikasikan bahwa kolagen yang diekstrak termasuk kolagen tipe I (Nalinanon *et al.* 2011). Glisina merupakan asam amino utama penyusun kolagen dengan kadar yang paling tinggi dibandingkan dengan asam amino lainnya (Kittiphattanabawon *et al.* 2005). Komposisi asam amino glisina yang tinggi disebabkan ketersediaan glisina sangat penting pada

setiap sekuens dasar -Gly-X-Y- dalam pembentukan 3 rantai  $\alpha$  pada molekul *tropocollagen*, yang mana posisi X adalah prolina dan Y adalah hidroksiprolina (Cherim *et al.* 2016). Katilli (2009) menjelaskan bahwa glisina dapat bergabung dengan lisina dan vitamin C yang akan membentuk jaringan kolagen, sedangkan alanina berfungsi dalam membantu metabolisme glukosa energi tubuh dan memperkuat membran sel. Selain glisina dan alanina, prolina pada kolagen juga berperan dalam meningkatkan stabilitas kolagen (Voet *et al.* 2013) dan menjaga integritas struktur heliks kolagen (Tamilmozhi *et al.* 2013). Struktur heliks kolagen dibentuk oleh struktur triplet utama yaitu sekuens -Gly-X-Y- yang dominan dibentuk oleh asam amino glisina-prolina-hidroksiprolina (Lodish *et al.* 2000). Asam amino prolina dan hidroksiprolina (*imino acid*) memiliki cincin pirolidina yang berfungsi membatasi konformasi rantai polipeptida kolagen dan memperkuat stabilitas termal *triple helix* (Huang *et al.* (2011) Hasil pengujian komposisi protein dan asam amino gelembung renang ikan patin mengindikasikan gelembung renang tersebut berpotensi sebagai sumber alternatif terbarukan yang menjanjikan dari hasil samping perairan untuk diaplikasikan menjadi produk berbasis kolagen.

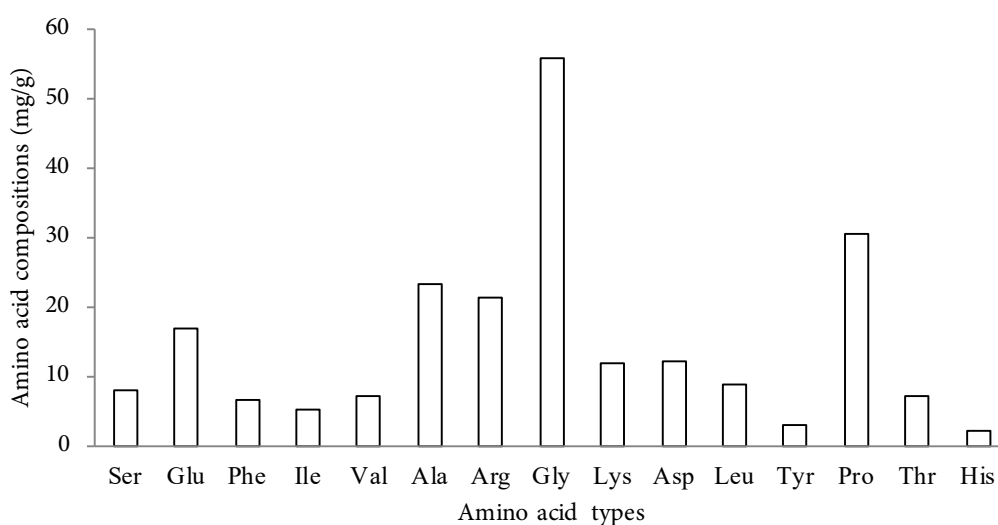


Figure 1 Amino acid compositions swim bladders of catfish.



### Konsentrasi Protein Terlarut NaOH

Ekstraksi kolagen diawali dengan perlakuan *pretreatment* yaitu penghilangan protein nonkolagen, lemak, mineral, pigmen dan pengotor lainnya menggunakan larutan alkali misalnya natrium hidroksida (NaOH) (Sinthusarman *et al.* 2013). NaOH memiliki kemampuan yang baik dalam menghilangkan protein nonkolagen dan lemak, mampu meminimalkan kelarutan protein kolagen serta dapat memecah sebagian besar daerah telopeptida pada molekul kolagen yang mengakibatkan terjadinya pengembangan (*swelling*) pada jaringan gelembung renang sehingga protein nonkolagen, lemak dan pengotor lainnya yang terjerat di dalam matriks kolagen akan mudah dilarutkan (Zhou dan Regenstein 2005; Liu *et al.* 2015). Hasil uji protein terlarut pada gelembung renang ikan patin dengan perendaman larutan NaOH setiap 2 jam ditunjukkan pada *Figure 2*.

Kandungan protein terlarut dari larutan NaOH sisa perendaman gelembung renang semakin menurun seiring penambahan durasi perendaman. Protein nonkolagen banyak dilepaskan mulai dari 2 jam pertama perendaman yang diindikasikan dengan kandungan protein terlarut yang terus menurun hingga durasi perendaman selanjutnya. Fluktuasi kenaikan protein terlarut terjadi dari lama perendaman 6 jam

menuju 12 jam. Kenaikan jumlah protein terlarut tersebut diduga sebagian kolagen dalam gelembung renang ikan patin mulai terlarut, selain protein nonkolagen dalam larutan NaOH. Hal ini berhubungan dengan kemampuan NaOH dalam pemisahan untaian dari batang-batang serat kolagen. Kelebihan konsentrasi OH<sup>-</sup> mengakibatkan terputusnya sebagian ikatan kovalen dalam struktur kolagen (Jaswir *et al.* 2011). Yoshimura *et al.* (2000) menjelaskan bahwa larutan alkali menyerang terutama wilayah telopeptida dari struktur kolagen selama *pretreatment*, sehingga dapat menyebabkan kelarutan kolagen. Hasil sidik ragam (ANOVA) menunjukkan bahwa perlakuan terpilih untuk menghilangkan protein nonkolagen pada gelembung renang ikan patin adalah perendaman dalam larutan NaOH 0,05 M selama 6 jam karena cukup efektif dan stabil dalam melarutkan protein nonkolagen. Selain itu, konsentrasi tersebut dipilih karena tingkat penggunaan NaOH yang rendah sehingga lebih ramah lingkungan dan ekonomis. Hasil ini selaras dengan hasil penelitian Liu *et al.* (2015), penggunaan NaOH dengan konsentrasi 0,05 M dan 0,1 M dapat melarutkan protein nonkolagen tanpa menyebabkan kehilangan kolagen, sedangkan penggunaan NaOH diatas 0,1 M secara signifikan menyebabkan kehilangan kolagen.

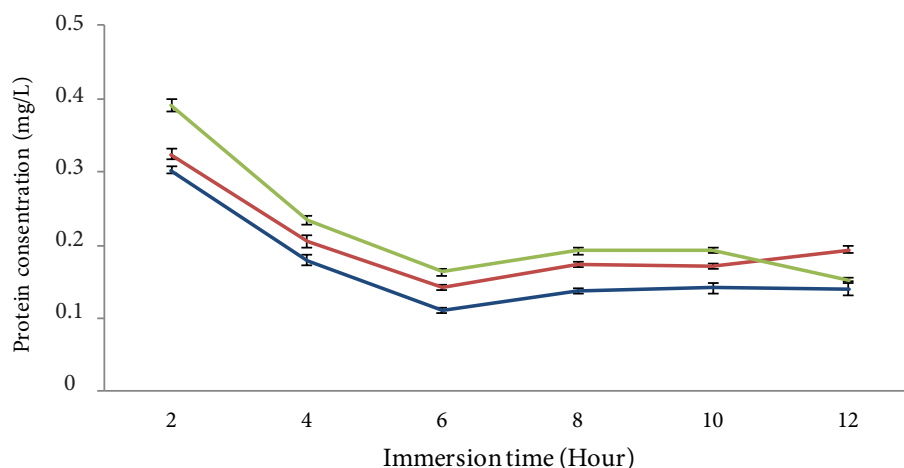


Figure 2 The concentration of protein dissolved remains the soaking swim bladders of catfish. NaOH 0.05 M (— K1); NaOH 0.1 M (— K2); dan NaOH 0.15 M (— K3).

### Ekstrak Kolagen Larut Enzim Papain Gelembung Renang Ikan Patin

Enzim papain merupakan enzim proteolitik hasil isolasi dari getah penyadapan buah pepaya (*Carica papaya*). Enzim papain termasuk golongan endopeptidase yang memutus ikatan peptida pada tempat-tempat tertentu di dalam molekul protein dan biasanya tidak memengaruhi gugus yang terletak di ujung molekul (Damodaran *et al.* 2008). Proses ekstraksi menggunakan enzim papain ini diawali dengan penambahan asam asetat, setelah *pretreatment* yang bertujuan untuk mengubah struktur kolagen. Selain itu, juga untuk mengatur pH agar selama ekstraksi pH dalam kondisi asam. Song *et al.* (2014) menyatakan bahwa pH 3 merupakan pH maksimum dalam ekstraksi kolagen menggunakan enzim papain. Li *et al.* (2013) juga menjelaskan bahwa pH 3 dan 4 merupakan pH maksimum dalam mengekstraksi menggunakan enzim. Nilai pH yang semakin tinggi hingga mendekati pH netral menyebabkan ekstraksi kolagen yang dihasilkan rendah. Penggunaan enzim papain ditujukan untuk peningkatan kemurnian dan kualitas produk serta mengurangi waktu dalam memproduksi kolagen. Perlakuan terpilih dari berbagai konsentrasi enzim papain berdasarkan parameter kelarutan kolagen. Hasil pengujian kelarutan kolagen dapat dilihat dari *Figure 3*.

Hasil uji kelarutan kolagen menunjukkan bahwa perlakuan kontrol memiliki kemampuan paling minimum dalam melarutkan kolagen dan perlakuan konsentrasi enzim 5.000 U/mg menghasilkan kelarutan kolagen tertinggi dibandingkan perlakuan lainnya. Nilai kelarutan kolagen semakin menurun seiring dengan penambahan jumlah konsentrasi enzim. Perlakuan konsentrasi enzim 5.000 U/mg tidak berbeda nyata dengan konsentrasi enzim 10.000 U/mg tetapi berbeda nyata dengan perlakuan konsentrasi 15.000 U/mg dan 20.000 U/mg. Hasil ini berbeda dengan penelitian Nurilmala *et al.* (2019) yang menjelaskan bahwa kelarutan kolagen kulit tuna yang diekstraksi dengan papain konsentrasi 3.000 U/mg, 5.000 U/mg dan 7.000 U/mg tidak memberikan efek yang signifikan terhadap kelarutan kolagen. Penambahan konsentrasi enzim papain yang lebih tinggi diduga menyebabkan enzim papain menjadi jenuh terhadap substrat sehingga dengan peningkatan konsentrasi enzim menunjukkan hasil yang tidak berpengaruh nyata. Selain itu, enzim papain merupakan enzim yang sangat kuat, sedangkan gelembung renang memiliki struktur jaringan yang cukup rapuh. Penambahan konsentrasi enzim papain yang terlalu tinggi yaitu 15.000 dan 20.000 U/mg pada gelembung renang ikan patin akan merusak ikatan peptida kolagen gelembung renang ikan patin, sehingga tidak hanya

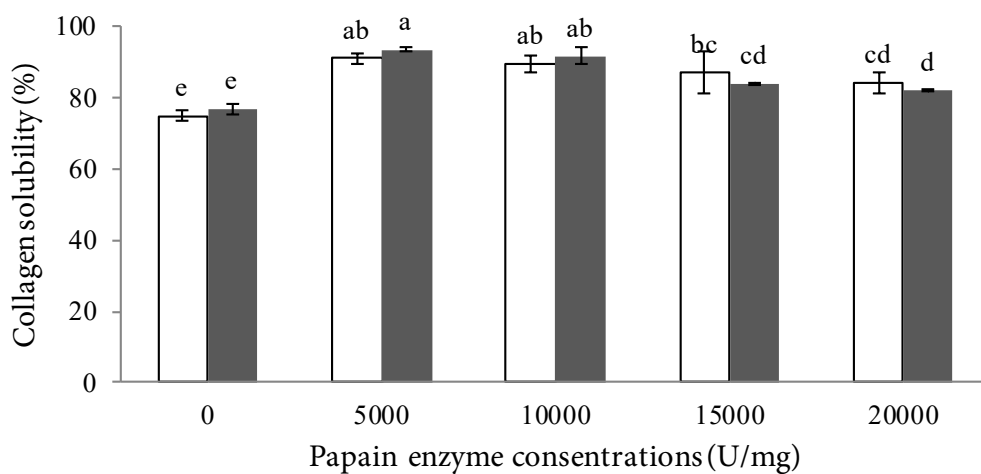


Figure 3 Solubility of catfish swim beller collagen with a combination of the concentration of the papain enzyme and the time of soaking. Soaking for 24 hours (□) and soaking for 48 hours (■).

daerah telopeptidanya saja yang akan terputus melainkan juga bagian tropokolagennya. Penggunaan konsentrasi enzim yang tepat tidak menyebabkan kerusakan pada struktur molekul melainkan hanya akan memutus ikatan silang (*cross-linked*) pada daerah telopeptida kolagen sehingga dapat meningkatkan jumlah kelarutan kolagen (Di *et al.* 2014).

### Gugus Fungsi Kolagen

Gugus fungsi merupakan salah satu karakteristik penting yang dapat menentukan sifat fungsional kolagen. Gugus fungsi khas yang ditemukan pada kolagen adalah berdasarkan struktur-struktur penyusun kolagen yang berada pada puncak serapan amida A, amida B, amida I, amida II dan amida III. Hasil FTIR kolagen larut enzim papain (PaSC) dapat dilihat pada *Figure 4*.

Keberadaan gugus amida A pada kolagen gelembung renang ikan patin ditunjukkan dengan puncak wilayah serapan pada  $3.430\text{ cm}^{-1}$ . Gugus amida A merupakan gugus fungsi khas yang menyusun kolagen yang ditandai dengan eksistensi NH *stretching* pada puncak wilayah serapan  $3.400\text{-}3.440\text{ cm}^{-1}$  (Muyonga *et al.* 2004<sup>b</sup>). Gugus amida B pada kolagen gelembung renang ikan patin menunjukkan puncak wilayah serapan pada  $2.959\text{ cm}^{-1}$ . Kong

dan Yu (2007) menyatakan bahwa puncak serapan gugus amida B mendekati nilai  $3.100\text{ cm}^{-1}$  yang terbentuk dari asimetrikal *stretching*  $\text{CH}_2$ . Gugus amida I pada kolagen gelembung renang ikan patin berada pada puncak wilayah serapan  $1.658\text{ cm}^{-1}$  yang menunjukkan C=O *stretching* dengan puncak serapan  $1.600\text{-}1.690\text{ cm}^{-1}$  (Kong dan Yu 2007). Gugus amida II dan amida III pada kolagen gelembung renang ikan patin terdeteksi dengan puncak wilayah serapan  $1.550\text{ cm}^{-1}$  dan  $1.454\text{ cm}^{-1}$ . Kong dan Yu (2007) melaporkan gugus amida II dan III ditandai dengan CN *stretching* dan NH *bending* yang menunjukkan interaksi intermolekuler pada kolagen. Kaewdang (2015) juga menemukan gugus amida II dan amida III terdeteksi pada puncak serapan  $1.549\text{ cm}^{-1}$  dan  $1.454\text{ cm}^{-1}$  yang memperlihatkan adanya struktur tripel heliks. Belbachir *et al* (2009), intensitas gugus amida III berkaitan dengan struktur *triple helix*.

### Stabilitas Termal

Analisis termal digunakan untuk memahami sifat termodinamis material. Stabilitas termal merupakan karakteristik fisik khas kolagen yang digunakan untuk memahami sifat termodinamis dari kolagen, selain mengetahui suhu denaturasi kolagen. Kolagen sensitif terhadap denaturasi struktur

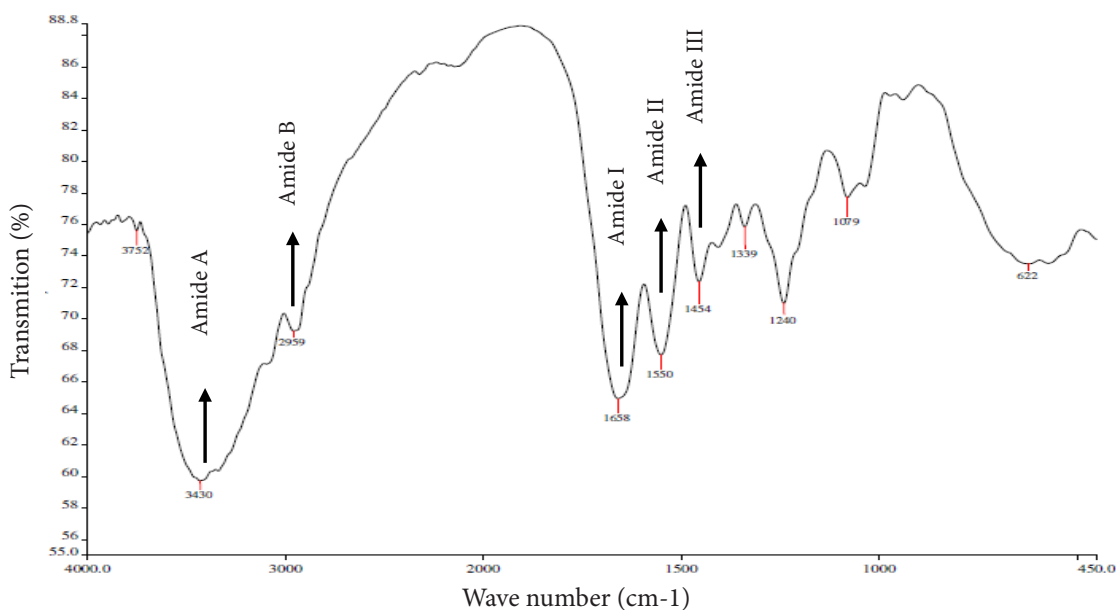


Figure 4 Spectra of FTIR catfish swim bladders collagen soluble in the enzyme papain.



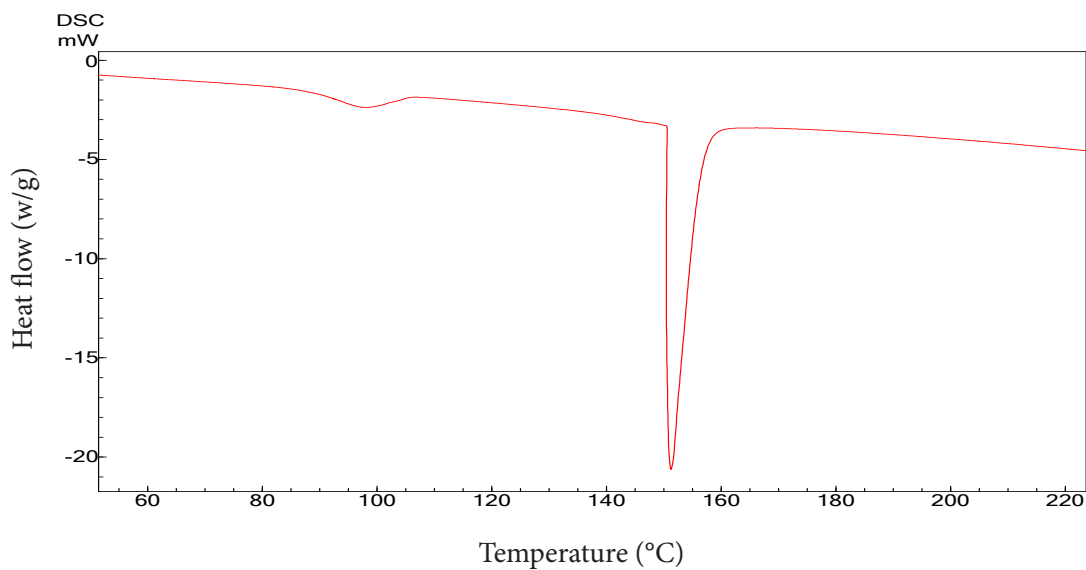


Figure 5 Curve of thermal stability catfish swim bladders collagen soluble in the enzyme papain.

menjadi gelatin apabila suhu melewati stabilitas termal kolagen (Rochdi *et al.* 2000; Zidek 2016). Kurva stabilitas termal PaSC dapat dilihat pada *Figure 5*.

Hasil menunjukkan bahwa kolagen gelembung renang ikan patin memiliki suhu transisi gelas ( $T_g$ ) 88°C. Suhu transisi gelas kolagen gelembung renang ikan patin lebih tinggi dibandingkan gelembung renang ikan cunang (ekstraksi asam/ASC) hasil penelitian Djailain (2016) yang memiliki  $T_g$  63°C. Sinthusamran *et al.* (2013) melaporkan semakin tinggi nilai  $T_g$  maka akan meningkatkan stabilitas termal. Perbedaan transisi gelas ( $T_g$ ) dikaitkan dengan kandungan asam amino yang terdapat di dalam kolagen yakni prolina dan hidroksiprolina (Kittiphattanabawon *et al.* 2005). Bae *et al.* (2008) menegaskan terdapat korelasi antara kandungan *imino acid* (prolina dan hidroksiprolina) dengan termostabilitas kolagen yang berasal dari hasil perairan, kolagen yang mempunyai kandungan *imino acid* tinggi akan lebih tahan terhadap panas.

## KESIMPULAN

*Pretreatment* dengan perlakuan konsentrasi NaOH 0,05 M dengan lama perendaman selama 6 jam merupakan perlakuan terpilih dalam menghilangkan protein nonkolagen pada gelembung renang ikan patin. Kolagen yang diekstrak

menggunakan enzim papain (PaSC) konsentrasi 5.000 U/mg merupakan perlakuan terpilih dalam menghasilkan kolagen yang berkualitas yang dicirikan dengan adanya struktur *triple helix* dari hasil pengujian FTIR dan memiliki stabilitas termal yang tinggi.

## DAFTAR PUSTAKA

- Alberts B, Johnson A, Lewis J. 2002. *Molecular Biology of the Cell*. New York (US): Garland Science.
- [AOAC] Association of Official Analytical Chemist. 2005. *Official Method of Analysis (18 ed) of The Association of Official Analytical Chemist Inc.* Maryland (US): AOAC
- Bae I, Osatomi K, Yoshida A, Osako K, Yamaguchi A, Hara K. 2008. Biochemical properties of acid-soluble collagens extracted from the skins of underutilized fishes. *Food Chemistry*. 108(1):49-54.
- Belbachir K, Noreen R, Gouspillo G, Petibois C. 2009. Collagen types analysis and differentiation by FTIR spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 395(3):829-837.
- Bradford MM. 1976. A rapid dan sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72(1-2):

- 248-254.
- 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*). *Food Science and Technology*. 66: 453-459.
- Cherim M, Mustafa A, Cadar E, Lupaşcu N, Paris S, Sirbu R. 2016. Collagen sources and areas of use. *European Journal of Interdisciplinary Studies*. 2(1):122-128.
- Damodaran S, Kirk LP, Fennema OR. 2008. *Fennema's Food Chemistry Fourth Edition*. Boca Raton (US): CRC Press.
- Di Y, Chang-Feng C, Bin W, Guo-Fang D, Rui LZ. 2014. Characterization of acid and pepsin-soluble collagens from spines and skulls of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). *Chinese Journal of Natural Medicines*. 12(9):712-720.
- Djailani FM. 2016. Optimasi ekstraksi dan karakterisasi kolagen dari gelembung renang ikan cunang (*Congresox talabon*) [Tesis]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Djailani F, Trilaksani W, Nurhayati T. 2016. Optimasi ekstraksi dan karakterisasi kolagen dari gelembung renang ikan cunang dengan metode asam-hidroekstraksi. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 19(2): 156-167.
- Duan R, Zhang JJ, Du XQ, Yao XC, Konno K. 2009. Properties of collagen from skin, scale and bone of carp (*Cyprinus carpio*). *Food Chemistry*. 112(3): 702-706.
- Fernandes RMT, Couto N, R G, Paschoal CWA, Rohling JH, Bezerra CWB. 2008. Collagen films from swim bladders: Preparation method and properties. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 62(1): 17-21.
- Gadi SD. 2017. Kolagen larut asam dari gelembung renang ikan cunang (*Muraenesox talabon*) sebagai sediaan krim pelembab wajah [Tesis]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Gadi DS, Trilaksani W, Nurhayati T. 2017. Histologi, ekstraksi dan karakterisasi kolagen gelembung renang ikan cunang *muraenesox talabon*. *Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis*. 9(2):665-683.
- Guillen MC, Gomez JT, Fernandez MD, Ulmo N, Lizarbe MA, Montero P. 2002. Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: a comparative study. *Food Hydrocolloids*. 16(1): 25-34.
- Guillen MCG, Gimenez B, Caballero MEL, Montero MP. 2011. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative source: A review. *Food Hydrocolloids*. 25(8): 1813-1827.
- Huang YR, Shiau CY, Chen HH, Huang BC. 2011. Isolation and characterization of acid and pepsin-solubilized collagens from the skin of balloon fish (*Diodonholocanthus*). *Food Hydrocolloids*. 25(6): 1507-1513.
- Idrus S, Hadinoto S dan Kolanus MPJ. 2018. Karakterisasi kolagen gelembung renang tuna sirip kuning (*Thunnus albacares*) dari perairan Maluku menggunakan ekstraksi asam. *Bioteknologi Proses Pangan Lingkungan Industri*. 9(2): 87-94.
- 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.
- Jaswir I, Monsur HA dan Salleh HM. 2011. Nano-structural analysis of fish collagen extracts for new process development. *Biotechnology*. 10(81): 18847-18854.
- Kaewdang O, Benjakul S, Kaewmanee T, Kishimura H. 2014. Characteristic of collagens from the swim bladders of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*). *Food Chemistry*. 155: 264-270.
- Kaewdang O. 2015. Value-added products from yellow fin tuna swim bladder: collagen dan gelatin [Tesis]. Songkla (TH): Prince of Songkla University.
- Kartika IWD. 2017. Karakterisasi dan biokompatibilitas kolagen gelembung renang ikan cunang (*Muraenesox talabon*) sebagai biomaterial *scaffold* kultur sel [Tesis]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Kartika IWD, Trilaksani W, Adnyane IKM. 2016. 2016. Karakterisasi kolagen dari limbah gelembung renang ikan cunang hasil ekstraksi asam dan hidrotermal. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 19(3): 222-232.

- Katilli AS. 2009. Struktur dan fungsi protein kolagen. *Journal Pelangi Ilmu*. 2(5):19-29.
- [KKP] Kementerian Kelautan dan Perikanan. 2018. *Produktivitas perikanan Indonesia. Pusat Data Statistika dan Informasi Kementerian Kelautan dan Perikanan Tahun 2018*. Jakarta (ID): Kementerian Kelautan dan Perikanan.
- Kittiphattanabawon P, Benjakul S, Visessanguan W, Nagai T, Tanaka M. 2005. Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). *Food Chemistry*. 89(3): 363-372.
- Kong J, Yu S. 2007. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica*. 39(8): 549-559.
- Kumar MH, Spandana V, and Poonam T. 2011. Extraction and determination of collagen peptide and its clinical importance from tilapia fish scales (*Oreochromis niloticus*). *International Research Journal of Pharmacy*. 2(10): 97-99.
- Laheng S, Setiawati M, Jusadi DD, Suprayudi MA. 2016. Aplikasi pemberian ekstrak dan tepung daun kayu manis pada pakan terhadap kualitas daging ikan patin. *Jurnal Pengolahan Hasil Perairan Indonesia*. 19(1): 36-43.
- Li ZR, Wang B, Chi CF, Zhang QH, Gong YD, Tang JJ, 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(1): 103-113.
- Liu D, Liang L, Regenstein JM, Zhou P. 2012. Extraction dan characterisation of pepsin-solubilised collagen from fins, scales, skins, bones dan swim bladders of bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*). *Food Chemistry*. 133(4): 1441-1448.
- Liu D, Zhang X, Li T, Yang H, Zhang H, Regenstein MJ, Zhou P. 2015. Extraction dan characterization of acid dan pepsin soluble collagens from the scales, skins dan swim bladders of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Food Bioscience*. 9: 68-74.
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. 2000. *Molecular Cell Biology*, 4th Edition. New York (US): WH Freeman.
- Muyonga JH, Cole CGB, Duodu KG. 2004<sup>a</sup>. Characterisation of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). *Food Chemistry*. 85(1): 81-89.
- Muyonga JH, Cole CGB, Duodu KG. 2004<sup>b</sup>. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). *Food Chemistry*. 86(3): 325-332.
- Nollet LML. 1996. *Handbook of Food Analysis: Physical characterization dan nutrient analysis*. Edisi ke-2. New York (US): CRC Press LLC.
- Nalinanon S, Benjakul S, Kishimura H, Osaka K. 2011. Type I collagen from the skin of ornate threadfin bream (*Nemipterus hexodon*): Characteristics and effect of pepsin hydrolysis. *Food Chemistry*. 125(2):500-507.
- Nurilmala M, Pertiwi RM, Nurhayati T, Fauzi S, Batubara I, Ochiai Y. 2019. Characterization of collagen and its hydrolysate from yellowfin tuna *Thunnus albacares* skin and their potencies as antioxidant and antiglycation agents. *Fisheries Science*. 85(3): 591-599.
- Potaros T, Raksakulthai N, Runglerdkreangkrai J, Worawattanamateekul W. 2009. Characteristics of collagen from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin isolated by two different methods. *Kasetsart Journal*. 43(3): 584-593.
- Riyanto B. 2006. Pengembangan pelapis *edible* dari *isinglass* dan aplikasinya untuk mempertahankan mutu udang masak [thesis]. Bogor (ID): Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor.
- Rochdi A, Foucat L, Renou JP. 2000. NMR and DSC studies during thermal denaturation of collagen. *Food Chemistry*. 69(3): 295-299.
- Sinthusamran S, Benjakul S, Kishimura H. 2013. Comparative study on molecular characteristics of acid soluble collagens from skin dan swim bladder of seabass

- (*Lates calcarifer*). *Food Chemistry*. 138(4): 2435-2441.
- 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 Science*. 3(4): 270-278.
- Steel RGD, Torrie JH. 1993. *Prinsip dan Prosedur Statistika, Suatu Pendekatan Biometrik*. Terjemahan dari: *Principles and Procedures of Statistics*. Penerjemah. Sumantri B. Jakarta (ID): Gramedia Pustaka Utama.
- Tamilmozhi S, Veeruraj A, Arumugam M. 2013. Isolation and characterization of acid and pepsin-solubilized collagen from the skin of sailfish (*Istiophorus platypterus*). *Food Research International*. 55: 1499-1505.
- Trilaksani W, Nurjanah, Utama HW. 2006. Pemnfaatan gelembung renang ikan patin (*Pangasius hypophthalmus*) sebagai bahan baku isinglass. *Buletin Teknologi Hasil Perikanan*. 9(1): 12-25.
- Voet D, Voet JG, Pratt CW. 2013. *Principles of Biochemistry: International Student Version*. 4th ed. Singapore (SG): Hoboken John Wiley dan Sons.
- Wong DWS. 1989. *Mechanism and Theory in Food Chemistry*. New York (US): Van Nostrand Reinhold.
- Yanuardi A. 2006. Karakteristik kimia gelembung renang ikan patin (*Pangasius sp.*) pada berbagai suhu penyimpanan [skripsi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Yoshimura K, Terashima M, Hozan D, Shirai K. 2010. Preparation and dynamic viscoelasticity characterization of alkali-solubilized collagen from shark skin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48(3): 685-690.
- 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(5): 161-179.
- Zhou P, Regenstein JM. 2005. Effects of alkaline dan acid pretreatments on *Alaska Pollock* skin gelatin extraction. *Journal of Food Science*. 70(6): 392-396.
- Zidek J, Vojtova L, Abdel-Mohsen AM, Chmelik J, Zikmund T, Brtnikova J, Jakubicek R, Zubal L, Jan J, Kaiser J. 2016. Accurate micro-computed tomography imaging of pore spaces in collagen-based scaffold. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 1. 27(6): 1-8.