

KARAKTERISTIK KOLAGEN LARUT ASAM TERIPANG GAMA (*Stichopus variegatus*)

Mega Safithri^{1,3*}, Kustiariyah Tarman^{2,3}, Pipih Suptijah^{2,3}, Sri Novita Sagita¹

¹Departemen Biokimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Darmaga, Jalan Agatis, Kabupaten Bogor 16680 Jawa Barat Telepon 0251 8423267

²Departemen Teknologi Hasil Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, IPB, Jalan Agatis, Kampus IPB Dramaga, Kabupaten Bogor, 16680 Jawa Barat Telepon 0251 8622915

³Divisi Bioteknologi Kelautan, Pusat Kajian Sumberdaya Pesisir dan Lautan, Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat, Institut Pertanian Bogor

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

Diterima: 12 Januari 2020/Disetujui: 30 April 2020

Cara sitasi: Safithri M, Tarman K, Suptijah P, Sagita SN. 2020. Karakteristik kolagen larut asam teripang gama (*Stichopus variegatus*). *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 23(1): 166-177.

Abstrak

Kolagen dibutuhkan pada berbagai industri farmasi, makanan, dan kosmetik, sehingga memiliki nilai ekonomis yang tinggi. Komoditas perikanan terutama teripang gama dapat digunakan sebagai sumber kolagen yang halal. Tujuan penelitian ini adalah untuk menentukan karakteristik fisikokimia kolagen larut asam teripang gama. Perlakuan untuk mendapatkan protein kolagen dilakukan dengan misahkan protein non kolagen menggunakan perendaman dalam NaOH 0,1 M selama 48 jam kemudian di netralisasi. Tahap selanjutnya dilakukan hidrolisis dan ekstraksi protein kolagen dengan asam asetat 0,5 M selama 48 jam. Hasil pemisahan protein non kolagen menunjukkan kadar protein non kolagen sebesar 0,02 mg/mL. Rendemen kolagen teripang gama yang didapat sebesar 2,4%. Kolagen larut asam teripang gama memiliki karakteristik fisik yaitu, derajat putih 61,83%, suhu denaturasi pada 48°C, suhu transisi pada 87,80°C, dan suhu pelelehan pada 162,40°C, serta viskositas 5,37 cP. Karakter kimia kolagen larut asam teripang gama yaitu pH 6,12 dengan jenis asam amino penyusun kolagen, yaitu prolina 6,80%, alanina 10,61% dan glisina 12,63%, serta bilangan gelombang FTIR gugus fungsi yaitu amida I (1657,9), II (1572,0), dan III (1242,2) A (3406,3), dan B (2920,2) (cm⁻¹).

Kata kunci: asam amino, derajat putih, fisikokimia, FTIR, viskositas

Characteristics of Stichopus variegatus acid solution collagen

Abstract

Collagen is needed in various pharmaceutical, food and cosmetics industries, so it has high economic value. Fishery commodities especially *Stichopus variegatus* can be used as a halal source of collagen. The purpose of this study was to characterize physicochemical properties of *S.variegatus* acid soluble collagen. The isolation of collagen consisted of the separation of non-collagen proteins using 0.1 M NaOH solution and the hydrolysis of collagen using 0.5 M CH₃COOH for 48 hours. The *S. variegatus* contained 0.02 mg/mL of the non-collagen proteins. The yields of *S. variegatus* collagen was 2.4%. The physical characteristics of soluble acid collagen were whiteness degree 61.83%, denaturation temperature 48°C, transition temperature 87.80°C, melting temperature 162.40°C, and viscosity 5.37 cP. The identification of chemical characteristics of *S.variegatus* soluble acid collagen showed that the collagen had pH 6.12, and the yield of three amino acids that form the collagen were proline 6.80%, alanine 10.61% and glycine 12.63%. The FTIR wave number of the amide function showed group I (1657.9), II (1571.9), and III (1242.1) A (3406.2), and B (2920.2) (cm⁻¹).

Keywords: amino acid, FTIR, viscosity, physicochemical, whiteness

PENDAHULUAN

Kolagen komersial yang beredar di pasar sebagian besar bersumber dari jaringan tulang dan kulit sapi dan babi (Choi *et al.* 2013) yang tidak sesuai dengan keyakinan agama (Hidayat dan Siradj 2015) dan menimbulkan dampak buruk terhadap kesehatan (Silvipriya *et al.* 2015). Komoditas perikanan menjadi salah satu alternatif sumber kolagen yang berdampak baik terhadap kesehatan dan halal, karena selain digunakan sebagai bahan pangan juga banyak dimanfaatkan sebagai bahan biofarmaka. Komoditas perikanan yang saat ini mulai banyak dimanfaatkan salah satunya adalah teripang. Menurut Purcell (2014) kandungan kolagen yang terdapat dalam teripang mencapai 86% dari total protein pada tubuh teripang. Isolasi kolagen dari berbagai jenis teripang cukup banyak dilakukan, di antaranya isolasi kolagen dari *Stichopus japonicas* (Cui *et al.* 2007), *Stichopus vastus* (Abedin *et al.* 2012), dan *Stichopus hermannii* (Safithri *et al.* 2018).

Industri kosmetik, obat-obatan, dan pangan mengaplikasikan kolagen dalam bentuk produk yang memiliki nilai ekonomis tinggi. Andiristanti (2012) melaporkan ekstraksi kolagen dari teripang emas (*Stichopus hermannii*) dan diaplikasikan untuk pelembab kulit. Kualitas kolagen yang digunakan oleh industri harus memiliki karakteristik dan mutu dengan metode yang sesuai standar, sehingga diperlukan pengembangan metode isolasi dari teripang. Karakteristik kolagen ditentukan dari proses isolasi yang digunakan. Metode ekstraksi kolagen yang telah dilakukan pada hasil perikanan di Indonesia di antaranya menggunakan asam (Wulandari *et al.* 2015; Djailani *et al.* 2016; Astiana *et al.* 2016; Kartika *et al.* 2017; Pamungkas *et al.* 2018; Safithri *et al.* 2019), air (Kartika *et al.* 2017; Devi *et al.* 2017; Sitepu *et al.* 2019, serta bantuan enzimatis (Pamungkas *et al.* 2018; Nurilmala *et al.* 2019; Simamora *et al.* 2019).

Kolagen teripang gama (*Stichopus variegatus*) berhasil diekstraksi menggunakan metode air pada suhu 40°C (Alhana *et al.* 2015). Metode ekstraksi air menggunakan banyak peralatan laboratorium dan waktu yang cukup lama, sedangkan untuk teripang gama

dengan metode ekstraksi larutan asam belum dilakukan. Tujuan penelitian ini adalah untuk menentukan karakteristik fisik dan kimia kolagen larut asam teripang gama.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Teripang gama (*S.variegatus*) yang digunakan dalam penelitian ini didapatkan dari Nusa Tenggara Timur, Labuan Bajo. Bahan-bahan kimia yang digunakan adalah Natrium hidroksida (Sigma Aldrich) dan asam asetat 80% (Sigma Aldrich), albumin serum sapi (Sigma Aldrich) dan pereaksi Bradford (Sigma Aldrich). Instrumen yang digunakan adalah spektrofotometer (Thermo Scientific Genesys 10 UV), viskometer (Brookfield), kromameter (Lutron RGB 1002), dan *termal differential scanning calorimetry* (DSC-60 Shimadzu), neraca analitik (FS-Ar 210), pH meter (Hanna Instruments), *freeze dry* (Christ Alpha 2-4 LD UK), Spektroskopi *Fourier Transform Infrared* (Bruker Tensor 37 German), UPLC (ELSD Waters Acquity H-Class).

Metode Penelitian

Preparasi teripang gama

Teripang yang diperoleh dicuci sampai bersih dari pasir kemudian dimasukkan ke pendingin beku. Pengiriman teripang gama beku menggunakan jasa Argodan dengan mempertahankan suhu dingin dalam kotak *stereofom* yang diberi es, sehingga sampel teripang gama diterima di Lab dalam kondisi beku. Preparasi daging teripang gama merujuk pada preparasi daging teripang emas Safithri *et al.* (2018) dengan mencuci bersih kulit teripang gama, sehingga kotoran yang menempel hilang. Teripang gama yang telah bersih dibelah menggunakan pisau, lalu daging dipisahkan dari jeroan, gonad, dan kulit.

Pemisahan protein bukan kolagen

Pemisahan protein non kolagen teripang gama menggunakan metode Safithri *et al.* (2018) dengan modifikasi. Larutan NaOH 0,1 M (perbandingan 1:10 (b/v)) digunakan untuk merendam daging teripang gama selama 48 jam, setiap 6 jam larutan NaOH diganti

dan diuji kadar protein larutan tersebut menggunakan uji Bradford. Hal ini dilakukan untuk menentukan konsentrasi protein non kolagen pada larutan NaOH dan lama waktu perendaman terbaik, untuk menghilangkan protein yang bukan kolagen.

Hidrolisis kolagen dengan larutan asam

Hidrolisis kolagen dilakukan berdasarkan metode Safithri *et al.* (2018). Daging teripang gama hasil pemisahan protein non kolagen yang diperoleh, selanjutnya direndam pada suhu 4°C selama 48 jam menggunakan larutan CH₃COOH 0,5 M. Rasio daging teripang gama dengan CH₃COOH yang digunakan adalah 1:2 (b/v). Selanjutnya, rendaman disaring memakai kertas saring Whatman, dan dihasilkan protein kolagen bewujud cair, kemudian kolagen padat didapat dengan cara dikering-bekukan (*freeze dry*).

Metode Analisis

Pengukuran kadar protein

Pengukuran kadar protein bukan kolagen teripang gama memakai metode Bradford (1976). Albumin serum sapi (BSA) digunakan untuk standar protein. Larutan rendaman NaOH dipipet 100 µL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu reagen Bradford ditambahkan sebesar 5 mL, dan selama 5 menit larutan tersebut diinkubasi pada suhu ruang, lalu dilakukan pengukuran serapannya dengan spektrofotometer pada λ 610 nm. Konsentrasi larutan standar yang dipakai adalah 0; 400; 500; 600; 800; 1.000; dan 1.200 µg/mL. Pengukuran kadar protein standar dan sampel dilakukan triplo.

Pengukuran rendemen kolagen

Pengukuran nilai % rendemen kolagen teripang menggunakan metode AOAC (2005). Perhitungan % rendemen kolagen didapat dengan rasio bobot kering kolagen hasil isolasi dengan bobot bahan baku daging sebelum diisolasi. Perhitungan % rendemen kolagen menggunakan rumus:

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

Pengukuran pH

Pengukuran pH kolagen menggunakan prosedur AOAC (2005). Satu gram kolagen teripang gama dilarutkan dalam 50 mL akuades lalu dihomogenkan. Instrumen pH meter dihidupkan lalu dikalibrasi menggunakan standar larutan pH 7 dan pH 4, selanjutnya elektroda dicelupkan ke gelas piala yang berisi larutan kolagen, dan diukur nilai pH-nya.

Pengukuran viskositas

Pengukuran viskositas menggunakan prosedur analisis Safithri *et al.* (2019). Larutan asam asetat 0,5 M sebanyak 300 mL digunakan untuk melarutkan kolagen teripang gama dengan konsentrasi 0,3% (b/v). Larutan kolagen yang telah homogen sebanyak 250 mL diukur viskositasnya. Instrumen yang digunakan adalah viskometer Brokkfield dengan *spindle* no.2 pada 100 rpm.

Pengukuran derajat putih

Pengukuran derajat putih kolagen teripang menggunakan prosedur analisis Park (2005). Kolagen teripang sebanyak 1 g ditempatkan pada kertas putih. Pengambilan foto menggunakan kromameter (Lutron RGB 1002) dikerjakan triplo. Angka digital di kromameter menunjukkan hasil analisis. Sistem warna Hunter L* digunakan untuk menilai kecerahan sampel (warna kromatik, 0: hitam hingga 100: putih). Notasi Hunter a* digunakan untuk warna kromatik merah sampai hijau (0 hingga 100 menunjukkan merah; 0 hingga -80 menunjukkan hijau). Notasi Hunter b* digunakan untuk warna kromatik biru sampai kuning (0 hingga 70 untuk kuning; 0 hingga -70 untuk biru). Rumus perhitungan derajat putih adalah:

$$\text{Derajat putih} = 100 - [(100-L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2}]^{1/2}$$

Penentuan gugus fungsi menggunakan alat FTIR

Penentuan gugus fungsi menggunakan alat FTIR sesuai prosedur analisis Safithri *et al.* (2018). Kolagen teripang sebanyak 0,02 g dan 0,1 g kalium bromida dihaluskan menggunakan mortar sampai homogen. Campuran dimasukkan ke mesin pencetak

pelet untuk dicetak, lalu divakum. Serapan bilangan gelombang dari kolagen teripang dideteksi pada bilangan gelombang sekitar 4000-500 cm^{-1} . Spektrum tersebut dianalisis untuk menentukan gugus-gugus fungsi protein pada kolagen teripang.

Pengukuran konsentrasi asam amino

Pengukuran konsentrasi asam amino menggunakan prosedur analisis AOAC (2005). Tahap awal kolagen dihidrolisis menggunakan larutan HCl 6N dan dipanaskan 100°C, lalu hidrolisat dikeringkan. Hidrolisat kering diderivatisasi menggunakan larutan *phenylisothiocyanat*, lalu sampel disaring menggunakan kertas saring ukuran 0,45 μL kemudian diinjeksikan ke dalam UPLC. Fase gerak yang digunakan adalah asetonitril. Rumus yang digunakan untuk menghitung konsentrasi asam amino adalah :

$$\text{Konsentrasi asam amino} = \frac{\text{luas area sampel} \times C \times \text{FP} \times \text{BM} \times 100}{\text{luas area standar} \times \text{bobot sampel (g)}}$$

- C : Konsentrasi standar asam amino (ug/mL)
 FP : Faktor pengenceran
 BM : Bobot molekul setian asam amino (g/mol)

Penentuan titik leleh

Penentuan titik leleh menggunakan prosedur analisis Martianingsih dan Atmajaya (2009). Instrumen *Differential Scanning Calorimetry* (DSC) digunakan untuk analisis titik leleh, sehingga diketahui karakteristik termal dari kolagen yang dihasilkan. Sebanyak 0,005-0,01 g kolagen diletakkan dalam tempat berbahan aluminium, kemudian ditutup. Setelah itu alat DSC dikondisikan untuk memiliki kecepatan pemanasan 10°C/menit pada suhu 20°C-300°C.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Rendemen Kolagen dan Konsentrasi Protein Non Kolagen

Daging teripang gama direndam selama 48 jam dalam larutan basa NaOH dan setiap 6 jam larutan basa tersebut diganti. Konsentrasi protein bukan kolagen daging teripang gama cukup tinggi yaitu, 0,107 mg/mL yang didapat setelah perendaman NaOH 6 jam pertama, dan ada penurunan jumlah protein bukan kolagen pada 6 jam berikutnya. Kadar protein bukan kolagen 0,023 mg/mL diperoleh setelah 48 jam sampel direndam dalam larutan basa NaOH (*Table 1*). Penggunaan larutan NaOH dalam merendam daging teripang gama bertujuan untuk menghilangkan komponen bukan kolagen, di antaranya protein non kolagen (enzim dan fibrinogen), lemak, mineral, pigmen, dan odor.

Larutan NaOH dapat menyebabkan daging teripang mengalami pengembangan (*swelling*) sehingga mempermudah pelarutan protein non kolagen pada daging teripang (Potaros *et al.* 2009). Pengembangan daging teripang disebabkan daerah telopeptida molekul kolagen menjadi terbuka oleh larutan NaOH, sehingga air dapat mengeluarkan protein bukan kolagen dari matrik kolagen (Jaswir *et al.* 2011). Larutan basa NaOH selanjutnya dianalisis kadar protein dengan uji Bradford. Kadar protein dari larutan NaOH sisa pra-perlakuan menunjukkan penurunan seiring bertambahnya waktu perendaman. Hal ini menunjukkan protein nonkolagen larut pada larutan NaOH setiap bertambahnya waktu perendaman. Larutan basa berfungsi untuk melarutkan protein non kolagen dan safonikasi lemak yang terikat pada serat kolagen sehingga lemak akan keluar dari daging teripang (Zhou dan Regenstein 2005).

Table 1 Concentrations of non-collagen protein in NaOH solution

Hour to	Concentration (mg/mL)
6	0.107
12	0.088
18	0.052
24	0.050
30	0.047
36	0.038
42	0.037
48	0.023

Proses netralisasi dengan akuades dilakukan setelah pra-perlakuan dengan tujuan menghilangkan sisa-sisa bahan yang bukan kolagen pada daging teripang sehingga tidak memengaruhi pH asam asetat saat isolasi. Asam asetat digunakan untuk menghidrolisis kolagen daging teripang menjadi sederhana. Penggunaan larutan asam akan meningkatkan ion H^+ sehingga air masuk menuju struktur daging teripang dengan ikatan elektrostatis antar gugus polar pada kolagen daging teripang dengan ion H^+ yang berasal dari asam asetat. Asam asetat dapat mengubah struktur tersier kolagen dengan memutuskan ikatan ionic sehingga kolagen dapat larut (Jaswir *et al.* 2011). Jumlah kolagen yang terekstrak menggunakan asam sitrat dan asam klorida akan lebih rendah jika dibandingkan dengan menggunakan asam asetat. Hal ini karena asam asetat dapat memutus untai antar ikatan silang pada kolagen sehingga melarutkan kolagen yang tidak berikatan silang (Kasim 2013; Liu *et al.* 2015). Kolagen dapat larut sempurna menggunakan CH_3COOH 0,5 M (Liu *et al.* 2015). Konsentrasi asam asetat mengubah derajat keasaman (pH), sehingga dapat mengubah kerapatan muatan kolagen melalui interaksi elektrostatis dan berdampak pada perubahan struktur protein yang dapat meningkatkan kelarutan kolagen. Setelah proses ekstraksi, suspensi hasil perendaman dengan asam asetat disaring dan diperoleh filtrat kolagen cair. Kolagen cair dikeringbekukan dengan *freeze dryer* untuk diperoleh kolagen padat. Kolagen padat yang diperoleh dihitung rendemen untuk mengetahui banyaknya kolagen yang dihasilkan dari bahan baku dan keefektifan metode isolasi dan dikarakterisasi sifat fisikokimia kolagen teripang gama.

Nilai rendemen kolagen daging teripang gama yang didapatkan 2,43% (b/b) dan rendah dibandingkan dengan penelitian Yusida (2016) sebesar 2,54%, namun lebih tinggi dibandingkan dengan Damayanti (2017) 2,24%. Rendemen kolagen dipengaruhi oleh jenis bahan baku yang digunakan. Rendemen kolagen teripang gama yang dihasilkan lebih rendah dibandingkan dengan jenis teripang pasir (*Holothuria scabra*) 2,49% (Pamungkas 2014), tetapi lebih tinggi dibandingkan

dengan jenis teripang emas (*S. hermanni*) 0,66% (Safithri *et al.* 2018). Perbedaan nilai rendemen dikarenakan oleh cara isolasi kolagen yang digunakan berbeda. Faktor lain yang memengaruhi perbedaan nilai rendemen di antaranya yaitu perbedaan konsentrasi larutan untuk menghilangkan protein nonkolagen dan konsentrasi larutan asam untuk ekstraksi kolagen, bahan baku yang digunakan, suhu, dan waktu yang dipakai dalam proses ekstraksi (Potaros *et al.* 2009). Isolasi kolagen menggunakan enzim menghasilkan nilai rendemen yang lebih besar (Cui *et al.* 2007; Park *et al.* 2012; Siddiqui *et al.* 2013). Ekstraksi kolagen dengan modifikasi asam-enzim mampu menghasilkan rendemen kolagen yang lebih tinggi. Hal ini disebabkan karena enzim mampu memutus ikatan peptida dan ikatan silang pada ujung nonheliks kolagen. Selain itu ujung telopeptida pada rantai polimer juga terputus sehingga kelarutan kolagen dalam pelarut asam menjadi meningkat (Schrieber dan Gareis 2007).

Karakter Fisikokimia Kolagen Daging Teripang Gama

Nilai pH kolagen daging teripang gama yaitu 6,12 yang lebih besar dibandingkan nilai pH yang dilaporkan Fawzya *et al.* (2016) 6,08, namun lebih kecil dibandingkan hasil riset Alhana *et al.* (2015) dengan nilai pH 7,37. Perbedaan nilai pH dipengaruhi oleh metode ekstraksi dan konsentrasi asam asetat yang digunakan juga berbeda-beda. Penggunaan CH_3COOH 0,5 M memiliki nilai pH larutan yang lebih asam dibandingkan asam asetat yang digunakan pada metode ekstraksi dengan air sebesar 0,1-0,3% (Alhana *et al.* 2015). Metode ekstraksi menggunakan air melakukan tahapan penetralan setelah perendaman dengan asam asetat sedangkan metode kolagen larut air tidak dilakukan penetralan. Menurut BSN (2014) nilai pH kolagen berkisar 6,5-8,0. Nilai pH kolagen hasil tidak masuk dalam rentang nilai pH standar mutu kolagen, namun, jika kolagen diaplikasikan pada industri kosmetik maka nilai pH kolagen teripang gama masih dapat diterima karena syarat untuk pH kolagen berada pada rentang 3,8-4,7 (Peng *et al.* 2004).

Viskositas kolagen daging teripang gama yaitu $5,37 \pm 0,06$ cP. Kolagen hasil memiliki nilai viskositas lebih rendah dibandingkan penelitian Alhana (2015). Nilai viskositas dipengaruhi pergerakan molekul dalam larutan (Nishimoto *et al.* 2005). Bobot molekul kolagen hasil isolasi dapat memengaruhi nilai viskositas (Ogawa *et al.* 2004). Semakin besar bobot molekul maka pergerakan molekul dalam suatu larutan semakin berkurang sehingga berdampak pada nilai viskositas yang lebih besar (Mariod dan Adam 2013). Faktor-faktor yang dapat mengubah nilai viskositas antara lain jumlah molekul terlarut, temperatur, dan gaya tarik antar molekul (Zhang *et al.* 2011). Selain nilai pH dan viskositas, sifat fisik kolagen yang harus diketahui adalah derajat putih.

Derajat putih kolagen daging teripang gama yang diperoleh adalah sebesar $61,83 \pm 1,14\%$. Nilai tersebut lebih kecil jika dibandingkan dengan derajat putih kolagen teripang gama sebesar $69,01\%$ yang diekstraksi menggunakan air (Alhana *et al.* 2015). Derajat putih kolagen hasil lebih rendah dapat disebabkan oleh preparasi sampel yang kurang maksimal memisahkan daging dengan kulit sehingga pigmen kulit masih terdapat pada daging teripang. Derajat putih kolagen yang rendah juga dipengaruhi oleh

keefektifan dalam melarutkan pigmen selama praperlakuan. Jaswir *et al.* (2011) menyatakan bahwa perendaman dengan larutan basa menyebabkan pengembangan pada daging sehingga pigmen dalam daging akan mudah dieliminasi dan dikeluarkan.

Spektrum Gugus Fungsi Kolagen

Spektrum protein kolagen daging teripang gama menunjukkan puncak serapan khusus pada wilayah-wilayah amida yaitu I, II, III, A, dan B (Figure 1 dan Table 2). Bilangan gelombang amida A protein kolagen yang diekstraksi adalah $3406,29 \text{ cm}^{-1}$ dan kolagen standar yaitu $3332,99 \text{ cm}^{-1}$. Amida A protein kolagen teripang gama bergeser ke arah kiri atau ke arah yang lebih besar. Erizal *et al.* (2012) menyatakan bahwa kisaran wilayah Amida A berada pada $3440\text{-}3400 \text{ cm}^{-1}$ mengidentifikasi vibrasi regangan NH dan ikatan hidrogen. Keberadaan daerah amida A dapat dipengaruhi oleh gugus OH yang menunjukkan peran aktif molekul air pada kolagen. Puncak amida B kolagen teripang gama terletak pada bilangan gelombang $2920,22 \text{ cm}^{-1}$ dan tidak berbeda jauh dengan kolagen standar $2924,09 \text{ cm}^{-1}$. Kisaran wilayah Amida B berada pada $2935\text{-}2915 \text{ cm}^{-1}$ dan mengidentifikasi regangan CH_2 (Coates 2000). Jika dilihat bentuk ketajaman peak amida

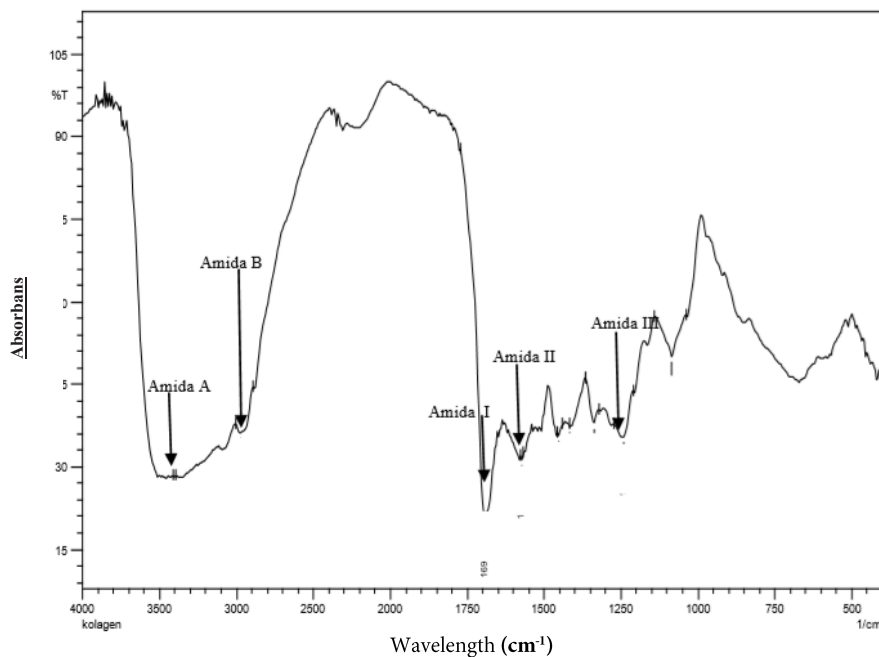


Figure 1 Infrared spectrum of *Stichopus variegatus* acid solution collagen

Table 2 Characteristics of collagen functional groups

Tipe Amide	Peak absorbancy of wave number (cm ⁻¹)			Characteristics Amide
	Acquired absorbancy	Standard of absorbancy area	Collagen Standard	
Amide A	3406,29	3350-3550 ¹	3332,99	NH <i>stretching</i> ¹
Amide B	2920,22	2935-2915 ²	2924,09	CH ₂ asymmetric <i>stretching</i> ²
Amide I	1657,91	1600-1700 ³	1647,21	C=O <i>stretching</i> ³
Amide II	1571,99	1480-1575 ³	1546,91	NH <i>bending</i> , CN <i>stretching</i> ³
Amide III	1242,16	1229-1301 ³	1334,74	NH <i>bending</i> , CN <i>stretching</i> ³

¹Erizal *et al.* (2012); ²Coates (2000); ³Kong dan Yu (2007)

B pada kolagen teripang gama dan kolagen standar, peak amida B kolagen standar lebih tajam dibandingkan *peak* amida B kolagen teripang gama. Hal ini mengindikasikan kemurnian kolagen teripang gama sangat rendah, dan masih banyak pengotor yang menyebabkan bentuk peak amida B yang dihasilkan tidak tajam.

Amida I protein kolagen teripang berada pada 1657,91 cm⁻¹ dan kolagen standar 1647,21 cm⁻¹. Kisaran wilayah Amida I berada pada 1700-1600 cm⁻¹ yang mengidentifikasi vibrasi regangan C=O. Spektra struktur sekunder pada gugus amida terletak pada serapan 1700-1660 cm⁻¹ (*turns*), 1654-1650 cm⁻¹ (*helix*), 1644-1640 cm⁻¹ (*rancom coil*), dan 1640-1620 cm⁻¹ (*sheet*) (Kong dan Yu 2007). Dengan demikian, kolagen teripang gama dan kolagen standar memiliki kesamaan struktur sekunder yaitu adanya struktur sekunder *helix*. Amida I berkorelasi erat dengan struktur sekunder protein (Muyonga *et al.* 2004).

Puncak amida II kolagen teripang gama terletak pada bilangan gelombang sebesar 1571,99 cm⁻¹ dan kolagen standar 1546,91 cm⁻¹. Kisaran wilayah amida II berada pada 1575-1480 cm⁻¹ dan menunjukkan adanya vibrasi tekuk NH dan regangan CN (Kong dan Yu 2007).

Kisaran wilayah amida III berada pada 1301-1229 cm⁻¹ dan mengidentifikasi interaksi intermolekuler kolagen yang berhubungan dengan tekuk NH dan regangan CN (Kong dan

Yu 2007). Amida III protein kolagen teripang pada 1242,16 cm⁻¹ dan kolagen standar 1334,74 cm⁻¹ (Table 2). Rasio antara Amida III protein kolagen teripang dengan serapan 1450 cm⁻¹ yaitu 1,03. Hal ini menunjukkan terdapatnya struktur tripel heliks yang mengindikasikan kolagen teripang belum terdegradasi menjadi bentuk gelatin karena nilainya mendekati 1. Nilai intensitas rasio 0,59 mengindikasikan kolagen terdenaturasi dan hilangnya struktur tripel heliks sehingga menjadi gelatin (Nikoo *et al.* 2011).

Asam Amino Kolagen

Kolagen daging teripang gama memiliki 4 jenis asam amino terbanyak yaitu glisina (12,63%), diikuti dengan asam glutamat (12,16%), lisin (11,54%), dan alanina (10,61%). Tiga kadar asam amino terendah yaitu histidina (0,09%), fenilalanina (2,84%) dan tirosina (3,26%) (Table 3). Glisina adalah asam amino terbanyak dalam kolagen. Komposisi asam amino kolagen teripang gama tertinggi adalah glisin (16,88%) (Fawzya *et al.* 2016). Aberoumand (2012) yang menyatakan proporsi glisina lebih banyak dibandingkan asam amino lainnya pada kolagen, karena di setiap tiga residu asam amino pada kolagen terdapat glisina dan berada ditengah pada rantai α , serta berperan membentuk kolagen pada rantai alfa tripel heliks (Matmaroh *et al.* 2011). Alanina dan prolina adalah asam amino pembentuk kolagen selain glisina. Berdasarkan

hasil analisis, kolagen teripang gama memiliki asam amino alanina (10,61%) dan prolina (6,80%). Asam amino daging teripang gama memiliki nilai sangat rendah adalah histidina dan tirosina. Kolagen tidak mengandung asam amino triptofan dan sisteina, dan kolagen memiliki kadar asam amino histidina dan tirosina yang rendah. Bahan baku kolagen yang sama dapat menyebabkan perbedaan komposisi asam amino penyusun kolagen. Hal ini dapat dikarenakan cara ekstraksi dan konsentrasi CH_3COOH yang digunakan berbeda (Aberoudmand 2012). Nurhayati *et al.* (2013) menyatakan penggunaan CH_3COOH konsentrasi yang tinggi akan memengaruhi proporsi asam amino dari kolagen dengan cara substitusi ion-ion sehingga dapat memutuskan struktur protein. Menurut Zeugolis *et al.* (2008) asam memiliki kinerja yang kuat untuk memecah ikatan-ikatan intermolekul rantai asam amino. Rantai asam amino tersebut mengalami denaturasi dan proses pelarutan sehingga mengalami kerusakan secara permanen.

Stabilitas Termal

Kurva termogram kolagen (*Figure 2*) menunjukkan bahwa kolagen memiliki 2 puncak eksotermik dan suhu denaturasi sebesar 48°C . Titik eksotermik yang ke-1 menunjukkan temperatur awal $82,9^\circ\text{C}$, temperatur akhir pelelehan $92,6^\circ\text{C}$, dan titik pelelehan $87,8^\circ\text{C}$. Puncak eksotermik ke-2 menunjukkan suhu awal $156,9^\circ\text{C}$, suhu

akhir pelelehan $173,3^\circ\text{C}$, dan titik pelelehan $162,4^\circ\text{C}$. Data juga menunjukkan suatu reaksi eksoterm dengan nilai entalpi yang bernilai negatif yaitu $-5,04 \text{ kJ/g}$ dan $-457,3 \text{ kJ/g}$.

Analisis termal adalah pengukuran sifat kimia fisika untuk mengetahui fase-fase transisi pada polimer. Denaturasi protein dapat terjadi karena perubahan struktur kuaterner, tersier, dan sekunder dari protein (Ogawa *et al.* 2004). Suhu denaturasi protein kolagen memiliki nilai sebesar 48°C , hasil ini lebih tinggi dari yang dilaporkan Abedin *et al.* (2012) *Stichopus vastus* $25,23^\circ\text{C}$ dan Safithri *et al.* (2019) *Chirocentrus dorab* 40°C serta lebih kecil dibandingkan Cui *et al.* (2007) *Stichopus japonicus* 57°C . Suhu denaturasi yang tinggi lebih stabil terhadap panas sehingga jika diaplikasikan tidak mudah rusak dalam proses pembuatan produk. Perbedaan suhu denaturasi kolagen dipengaruhi oleh bahan baku yang digunakan, suhu lingkungan dan suhu biologis tubuh organisme tersebut (Ogawa *et al.* 2004).

Kurva termogram DSC kolagen (*Figure 2*) memiliki 2 puncak eksotermik yang ditunjukkan entalpi bernilai negatif. Puncak eksotermik pertama merupakan suhu transisi gelas (T_g) kolagen sebesar $87,8^\circ\text{C}$ yang menunjukkan gelatinisasi kolagen karena putusannya ikatan hidrogen pada polimer amorf yaitu gelatin (Karim dan Bhat 2009). Puncak kedua merupakan nilai titik leleh (T_m) yang menunjukkan polimer berwujud cair. Nilai T_m dari kolagen adalah $162,4^\circ\text{C}$ dengan suhu

Table 3 Amino acid levels *Stichopus variegatus* acid soluble collagen

Jenis Asam amino	Konsentrasi (%)
Glycine	12.63
Glutamic acid	12.16
Arginine	5.84
Lysine	11.54
Alanine	10.61
Serine	9.63
Aspartic acid	8.18
Proline	6.80
Arginine	5.84
Threonine	4.56
Valine	4.20
Leucine Proline	4.13
Isoleucine	3.53
Tirosine	3.26
Phenylalanine	2.84
Histidine	0.09

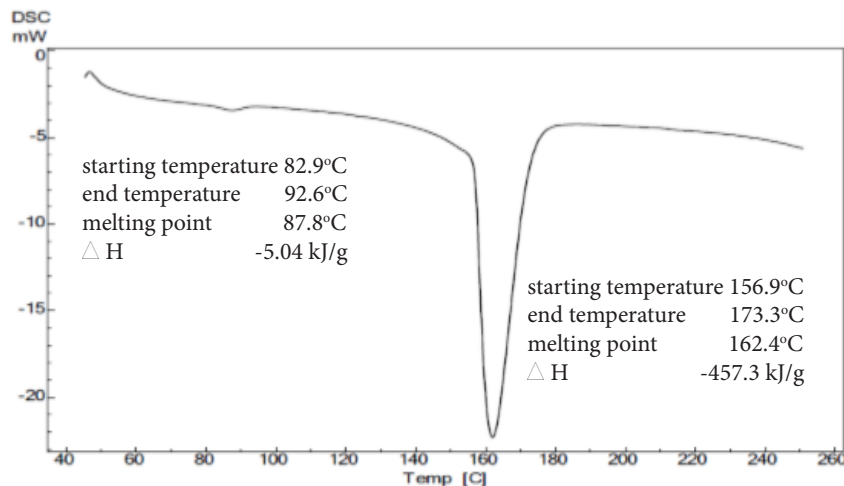


Figure 2 Thermogram of *Stichopus variegatus* acid soluble collagen

awal dan akhir pelelehan adalah 156,9°C dan 173,3°C. suhu transisi gelas dan titik leleh kolagen hasil lebih rendah dibandingkan dengan penelitian Alhana (2015) yaitu 100,94°C dan 163,67 °C dengan kolagen dari jenis bahan baku yang sama. Suhu transisi gelas dan titik leleh kolagen hasil lebih rendah disebabkan oleh pelarut ekstraksi yang dipakai berbeda. Isolasi protein kolagen teripang pada penelitian ini menggunakan asam asetat sebagai pengeskrak kolagen sedangkan Alhana *et al.* (2015) menggunakan metode ekstraksi dengan air sebagai pelarut kolagen. Ikatan intramolekul yang merupakan penstabil struktur tripel heliks kolagen dapat terputus oleh asam asetat (Ahmad dan Benjakul 2010). Asam amino prolina dan hidrosiprolina dapat meningkatkan stabilitas termal dengan cara menjaga integritas struktural kolagen. Komposisi asam amino prolina (6,80%) kolagen teripang pada penelitian ini lebih kecil jika dibandingkan dengan Alhana *et al.* (2015) yang memiliki kandungan prolina sebesar 7,41%. Hal ini yang menyebabkan stabilitas termal kolagen hasil juga lebih rendah dibandingkan dengan penelitian Alhana *et al.* (2015). Asam amino prolina memiliki turunan yaitu hidrosiprolina. Prolina memiliki cincin pirolidin yang dapat menstabilkan struktur kuarterner dan tersier rantai polipeptida protein sehingga tidak berubah menjadi struktur sekunder dan membantu menstabilkan rantai tripel heliks

(Bae *et al.* 2008; Zang *et al.* 2007). Gelse *et al.* (2003) mengemukakan hidrosiprolina membentuk ikatan hidrogen intramolekul dan membantu menjaga stabilitas termal pada rantai tripel heliks kolagen.

KESIMPULAN

Rendemen kolagen daging teripang gama yang diisolasi sebesar 2,43%. Karakteristik fisik kolagen teripang gama menunjukkan nilai pH 6,12, viskositas 5,37 cP, derajat putih 61,83%, temperatur denaturasi 48°C, temperatur transisi 87,8°C, dan temperatur pelelehan 162,4°C. Gugus fungsi dan komposisi asam amino kolagen yang diperoleh menunjukkan bahwa karakteristik kimia kolagen sudah sesuai.

DAFTAR PUSTAKA

- [AOAC]. Association of Official Analytical Chemist. 2005. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist*. Virginia (US): The Association of Analytical Chemist, Inc.
- [BSN] Badan Standardisasi Nasional. 2014. *Kolagen kasar dari sisik ikan-Syarat mutu dan pengolahan: SNI 8076-2014*. Jakarta (ID): Badan Standardisasi Nasional.
- Abedin MZ, Karim AA, Ahmed F, Latiff AA, Gan CY, Ghazali FC, Sarker MDI. 2012. Isolation and characterization of pepsin-solubilized collagen from the integument of sea cucumber (*Stichopus*

- vastus). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 93(5): 1083-1088.
- Aberoumand A. 2012. Comparative study between different methods of collagen extraction from fish and its properties. *World Applied Science Journal*. 16 (3): 316-319
- Ahmad M, Benjakul S. 2010. Extraction and characterisation of pepsin solubilised collagen from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*). *Food Chemistry*. 120:817-824.
- Alhana, Suptijah P, Tarman K. 2015. Ekstraksi dan karakterisasi kolagen dari daging teripang gamma (*Stichopus variegatus*). *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 18(2): 150-161.
- Alhana. 2015. Ekstraksi dan karakterisasi kolagen dan nanokolagen dari daging teripang gamma (*Stichopus variegatus*) [Tesis]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Andirsnanti WA. 2012. Uji manfaat ekstraksi kolagen kasar dari teripang *Stichopus hermanni* sebagai bahan pelembab kulit [tesis]. Depok (ID): Universitas Indonesia
- Astiana I, Nurjanah, Nurhayati T. 2016. Karakteristik kolagen larut asam dari kulit ikan ekor kuning. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 19(1): 79-93.
- Bae I, Osatomi K, Yoshida A, Osako K, Yamaguchi A, Hara K. 2008. Biochemical properties of acid-soluble collagens extracted from the skins of underutilised fishes. *Food Chemistry*. 108: 49-54.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72(1): 248-254
- Choi JH, Benham SH, Kim SM. 2013. Physico-biochemical characteristics of scallop mantle collagen soluble in pepsin. *Journal Agricultural Science and Technology* 15: 293-302
- Coates J. 2000. Interpretation of infrared spectra, a practical approach: Meyers RA, editor. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. USA (US): John Wiley & Sons Ltd.
- Cui FX, Xue CH, Zhao JL, Zhang YQ, Dong P, Fu XY, Gao X. 2007. Characterization and subunit composition of collagen from the body wall of sea cucumber *Stichopus japonicus*. *Food Chemistry*. 100: 1120-1125.
- Damayanti R. 2017. Karakterisasi toner penyegar wajah berbasis kolagen teripang gamma (*Stichopus variegatus*) dan kitosan [skripsi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Devi HLNA, Suptijah P, Nurilmala M. 2017. Efektifitas alkali dan asam terhadap mutu kolagen dari kulit ikan patin. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 20(2): 255-265.
- Djailani F, Trilaksana W, Nurhayati T. 2016. Optimasi ekstraksi dan karakterisasi kolagen dari gelembung renang ikan cunang dengan metode asam-hidro-ekstraksi. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 19(2): 156-167.
- Erizal, Basril AR, Setyo AK, Sulistioso GS, Sudirman. 2012. Pengaruh iradiasi gamma pada sifat fisiko-kimia kolagen dalam larutan. *Jurnal Sains Materi Indonesia*. 15 (4): 221-225.
- Fawzuya YN, Chasanah E, Poernomo A, Khirzin MH. 2016. Isolasi dan karakterisasi parsial kolagen dari teripang gamma (*Stichopus variegatus*). *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*. 11(1): 91-100
- Gelse K, Poschl E, Aigner T. 2003. Collagens-structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 55: 1531-1546.
- Hidayat AS, Siradj M. 2015. Sertifikasi halal dan sertifikasi non halal pada produk pangan industri. *Ahkam*. 15 (2): 199-210.
- Jaswir I, Monsur HA, Salleh HM. 2011. Nano-structural analysis of fish collagen extracts for new process development. *African Journal of Biotechnology*. 10(81):18847-18854
- Karim AA, Bhat R. 2009. Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. *Food Hydrocolloids*. 23:563-576
- Kartika IWD, Trilaksana W, Adnyane IKM. 2016. Karakterisasi kolagen dari limbah gelembung renang ikan cunang

- (Muraenesox talabon) hasil ekstraksi asam dan hidrotermal. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 19(3): 222-232
- Kasim S. 2013. Pengaruh variasi jenis pelarut asam pada ekstraksi kolagen ikan pari (*Himantura gerrardi*) dan ikan tuna (*Thunnus sp.*). *Majalah Farmasi dan Farmakologi*. 17(2): 35-38.
- Kong J, Yu S. 2007. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 39(8): 549-559
- Liu D, Wei G, Li T, Hua J, Lu J, Regenstein JM, Zhou P. 2015. Effects of alkaline pretreatments and acid extraction conditions on the acid-soluble collagen from grass carp (*Ctenopharyngodonidella*) skin. *Food Chemistry*. 172:836-843
- Mariod AA, Adam HF. 2013. Review: gelatin, source, extraction and industrial applications. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria* 12 (2): 135-147.
- Martianingsih N, Atmaja L. 2009. Analisis sifat kimia, fisik, dan termal gelatin dari ekstraksi kulit Ikan pari (*Himantura gerrardi*) melalui variasi jenis larutan asam. Prosiding KIMIA FMIPA – ITS.
- Matmaroh K, Benjakul S, Prodpran T, Encarnacion 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.
- Nikoo M, Xu X, Benjakul S, Xu G, Ramires-Suarez JC, Ehsani A, Kasankala LM, Duan X, Abass S. 2011. Characterization of gelatin from the skin of farmed Amur sturgeon *Acipenser schrenckii*. *International Aquatic Research* 3(2): 135-145.
- Nishimoto M, Sakamoto R, Mizuta S, Yoshinaka R. 2005. Identification and characterization of molecular species of collagen in ordinary muscle and skin of the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Journal Food Chemistry*. 90 (1-2): 151-156.
- Nurhayati, Tazwir, Murniyati. 2013. Ekstraksi dan karakterisasi kolagen larut asam dari kulit ikan nila (*Oreochromis niloticus*). *JPB Kelautan dan Perikanan*. 8 (1): 85-92.
- 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.
- Ogawa M, Portier JR, Moody MW, Bell J, Schexnayder MA, Losso JN. 2004. Biochemical properties of bone and scale collagens isolated from the subtropical fish black drum (*Pogonia cromis*) and sheepshead sea bream (*Archosargus probatocephalus*). *Food Chemistry*. 88: 495-501
- Pamungkas TH. 2014. Kajian potensi collagen pada teripang pasir (*Holothuria scabra*) dari Pulau Pramuka Kepulauan Seribu [skripsi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Pamungkas BF, Supriyadi, Murdiati A, Indrati R. 2018. Ekstraksi dan karakterisasi kolagen larut asam dan pepsin dari sisik haruan (*Channa striatus*) kering. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 21(3): 513-521
- Park JW. 2005. Ingredient technology for surimi and surimi seafood. Di dalam: Park JW, editor. *Surimi and Surimi Seafood* (Second Edition). Boca Raton (US): CRC Press.
- Park SY, Hee KL, Seogjae L, Hyeong CH, Somi KC, Moonjae C. 2012. Pepsin solubilized collagen (PSC) from red sea cucumber (*Stichopus japonicas*) regulates cell cycle and fibronectin synthesis in HaCaT cell migration. *Food Chemistry*. 132: 487-492.
- Peng Y, Glattauer V, Werkmeister JA, Ramshaw JAM. 2004. Evaluation for collagen products for cosmetic application. *Journal of Cosmestic Science*. 55:327-341.
- Potaras T, Raksakulthai N, Runglerdkreangkrai J, Worawattanamateekul W. 2009. Characteristics of collagen from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin isolated by two different methods. *Kasetsart Journal-Natural Science*. 43(3): 584-593.
- Purcell SW. 2014. *Processing Sea Cucumber into Beche-de-mer: A Manual for Pacific*

- Island Fishers*. Auckland (NZ): Stredder Print Ltd.
- Safithri M, Tarman K, Suptijah P, Widowati N. 2019. Karakteristik Fisikokimia Kolagen Larut Asam Dari Kulit Ikan Parang-Parang (*Chirocentrus dorab*). *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 22(3): 441-452
- Safithri M, Setyaningsih I, Tarman K, Suptijah P, Yuhendri VM, Meydia. 2018. Potensi Kolagen Teripang Emas Sebagai Inhibitor Tirosinase. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 21(2):295-303
- Schrieber R, Gareis H. 2007. *Gelatin Handbook. Theory and Industrial Practice*. Germany (DE): Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.
- Siddiqui YD, Arief EM, Yusoff A, Suzina AH, Abdullah SY. 2013. Isolation of pepsin solubilized collagen (PSC) from crude collagen extracted from body wall of sea cucumber (*Bohadschia spp.*). *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 5(2): 555-559.
- Silvipriya KS, Kumar KK, Bhat AR, Kumar BD, Jhon A, Lakshmanan P. 2015. Collagen: animal sources and biomedical application. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 5(3): 123-127.
- 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.
- Sitepu GSB, Santoso J, Trilaksani W. 2019. Kolagen gelembung renang ikan patin (*Pangasius sp.*) hasil ekstraksi asam. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 22(2): 327-339.
- Wulandari, Suptijah P, Tarman K. 2015. Efektivitas *pretreatment* alkali dan hidrolisis asam asetat terhadap karakteristik kolagen dari kulit ikan gabus. *Jurnal Pengolahan dan Hasil Perikanan Indonesia*. 18(3): 287-302.
- Yan M, Li B, Zhao X, Ren G, Zhuang Y, Hou H, Zhang X, Chen L, Fan Y. 2008. Characterization of acid soluble collagen from the skin of walleye Pollock (*Theragra chalcogramma*). *Food Chemistry*. 107: 1581-1586
- Yusida A. 2016. Formula sediaan krim berbasis nanokolagen teripang gamma (*Stichopus variegatus*) [skripsi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Zang Y, Liu W, Li G, Shi B, Miao Y, Wu X. 2007. Isolation and partial characterization of pepsin-soluble collagen from the skin of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Food Chemistry*. 103: 906-912.
- Zeugolis DI, Khew ST, Yew ESY, Ekaputra AK, Tong YW, Yung LL, Hutmacher DW, Sheppard C, Michael. 2008. Electro-spinning of pure collagen nano-fibres Just an expensive way to make gelatin. *Biomaterials*. 15 (1): 2293-2305.
- Zhang F, Wang A, Li Z, He S, Shao L. 2011. Preparation and characterisation of collagen from freshwater fish scales. *Food and Nutrition Sci*. 2:818- 823.
- Zhou P, Regenstein JM. 2005. Effects of alkaline and acid pretreatments on Alaska pollock skin gelatin extraction. *Journal of Food Science*. 70(6):392396.