

KARAKTERISTIK KOLAGEN KULIT TUNA SIRIP KUNING (*Thunnus albacares*) PADA WAKTU HIDRO-EKSTRAKSI BERBEDA DAN POTENSINYA DALAM BENTUK SEDIAAN NANOKOLAGEN

Syahril Rahmawan Kusa, Asri Silvana Naiu*, Nikmawatisusanti Yusuf

Universitas Negeri Gorontalo
Jl. Jend. Sudirman No.6, Dulalowo Tim., Kec. Kota Tengah,
Kota Gorontalo, Gorontalo, Indonesia, 96128.

*Penulis korespondensi: asrisilvananaiu@gmail.com
(Diterima 01-07-2022; Direvisi 11-07-2022; Dipublikasi 24-07-2022)

ABSTRACT

This study aimed to analyze the effect of hydro-extraction time on the characteristics of yellow fin tuna skin collagen and its potential in the form of nano-collagen preparations. This study was designed using a Completely Randomized Design (CRD). The treatment factor was the length of time for hydro-extraction of collagen which consisted of three levels, such as 1 hour, 3 hour, and 5 hour with two repetitions. The research data were analyzed by analysis of variance (ANOVA) and Duncan Multiple Range's Test. The results showed that the hydro-extraction time had a significant effect ($p < 0,05$) on the yield, protein content, and fat content. The best treatment was 5 hours hydro-extraction time with 4.6% yield, 82.96% of protein content, 1.91% of moisture content, 0.74% of fat content and pH value of 5.52. The results of the nano-collagen particle size observation based on the best treatment ranged from 73.80–693.72 nm.

Keyword: *Hydro-extraction, nano-collagen, particle size, tuna skin, characteristics*

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis pengaruh lama waktu hidro-ekstraksi terhadap karakteristik kolagen kulit ikan tuna sirip kuning dan potensinya dalam bentuk sediaan nano-kolagen. Penelitian ini dirancang menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL). Faktor perlakuan adalah lama waktu hidro-ekstraksi kolagen yang terdiri dari 3 level, yaitu 1, 3 dan 5 jam dengan dua kali pengulangan. Data hasil penelitian yang diperoleh dianalisis dengan analisis ragam (ANOVA) dan uji lanjut Duncan. Hasil analisis sidik ragam menunjukkan lama waktu hidro-ekstraksi berpengaruh nyata ($p < 0,05$) terhadap rendemen, kadar protein dan kadar lemak kolagen. Perlakuan terbaik yaitu lama waktu hidro-ekstraksi 5 jam dengan persentase rendemen 4,69 %, kadar protein 82,96 %, kadar air 1,91 %, kadar lemak 0,74 % dan nilai pH 5,52. Hasil pengamatan ukuran partikel nano-kolagen yang diperoleh berdasarkan kolagen perlakuan terbaik berkisar antara 73,80–693,72 nm.

Kata kunci: *Hidro-ekstraksi, nano-kolagen, ukuran partikel, kulit tuna, karakteristik*

PENDAHULUAN

Meningkatnya permintaan dan konsumsi ikan tuna baik di dalam maupun luar negeri selain berdampak positif untuk perekonomian juga memiliki dampak negatif, diantaranya adalah peningkatan limbah yang tidak dimanfaatkan. Salah satu limbah yang paling banyak dihasilkan dari industri pengolahan ikan tuna adalah kulit. Kulit ikan tuna mengandung protein tinggi sehingga berpotensi untuk dijadikan sumber kolagen yang aman dan halal (Mayasari, 2016). Menurut Chen *et al.*, (2016), kulit dan sisik memiliki kandungan kolagen yang lebih tinggi dibandingkan bagian tulang. Kolodziejska *et al.*, (2008), menyatakan bahwa kulit ikan merupakan bahan baku yang baik untuk mengisolasi kolagen karena kolagen merupakan penyusun 80% protein yang terdapat pada kulit ikan.

Saat ini penelitian dan pembuatan kolagen umumnya dilakukan dengan metode kimiawi, enzimatik, ataupun kombinasi antara proses kimiawi dan enzimatik (Guillen *et al.*, 2002). Ekstraksi kolagen secara kimiawi dapat dilakukan dengan proses asam. Asam organik yang banyak digunakan pada proses ini adalah asam asetat dan produknya disebut kolagen larut asam (ASC). Sedangkan ekstraksi secara enzimatik pada prosesnya menggunakan enzim pepsin dan produk yang dihasilkan disebut kolagen larut pepsin (PSC). Menurut Prasetyo (2018), kedua teknik ekstraksi tersebut dinilai masih memiliki banyak kekurangan diantaranya waktu ekstraksi lebih lama dan biaya yang relatif mahal.

Salah satu metode isolasi kolagen yang saat ini mulai dikembangkan yaitu menggunakan kombinasi metode ASC dengan hidro-ekstraksi. Metode hidro-ekstraksi telah dilakukan pada ekstraksi kolagen dari beberapa jenis ikan diantaranya pada kulit ikan cucut bambu (Mahardika, 2013), kulit ikan gabus (Wulandari, 2016) dan kulit ikan tongkol (Komala, 2015). Metode hidro-ekstraksi memiliki beberapa keuntungan antara lain waktu lebih singkat, sedikit memerlukan peralatan laboratorium, dapat diproduksi secara kontinyu, rendemen tinggi, limbah yang dihasilkan sedikit dan biaya produksi lebih rendah (Huang *et al.* 2016). Optimasi ekstraksi kolagen dengan metode hidro-ekstraksi dapat dilakukan dengan meningkatkan lama waktu hidro-ekstraksi. Kolanus *et al.* (2019) menyatakan bahwa perlu dilakukan peningkatan waktu hidro-ekstraksi agar ekstrak kolagen yang dihasilkan dapat terekstrak secara sempurna.

Secara umum pembuatan kolagen dari kulit ikan tuna sirip kuning telah dilakukan baik dengan metode ASC, PSC maupun kombinasi metode asam-hidro-ekstraksi tetapi tidak dalam bentuk nano-partikel. Ukuran partikel merupakan faktor penting untuk menentukan efektifitas penggunaan kolagen dalam bidang biomedis dan kosmetik. Material yang berukuran nano memiliki sifat kimia, fisika dan biologi yang lebih unggul dibandingkan dengan material yang berukuran lebih besar (Pringgandini, *et al.*, 2018).

Ekstraksi kolagen kulit ikan tuna menggunakan metode hidro-ekstraksi dan potensi sediaan nano-kolagen merupakan alternatif pemanfaatan limbah yang bernilai rendah menjadi produk dengan nilai jual dan nilai komersial yang lebih tinggi. Informasi mengenai optimasi lama waktu hidro-ekstraksi terhadap karakteristik kolagen kulit tuna sirip kuning dan potensinya dalam bentuk sediaan nano-partikel kolagen belum banyak diketahui, sehingga diperlukan penelitian mengenai hal tersebut.

MATERIAL DAN METODE

Bahan dan alat

Bahan utama yang digunakan pada penelitian ini adalah kulit ikan tuna ekor kuning yang diperoleh dari Usaha Kecil dan Menengah (UKM) Kirana Kota Gorontalo, NaOH, asam asetat (Merck), etanol 96% (Merck), akuades, kertas saring *Whatman* dan bahan untuk analisis proksimat.

Peralatan yang digunakan untuk pembuatan kolagen dan nano-kolagen adalah *waterbath incubator* (Memmert, Jerman), timbangan digital (Mettler 3600), thermometer, *stirrer*, *magnetic stirrer*, pH meter, mikroskop cahaya (Olympus, BX53F2), *Sentrifuse* (Hettich, EBA 20), oven (Memmert, Jerman), dan peralatan untuk analisis proksimat.

Prosedur penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam tiga tahap yaitu, 1) Pembuatan kolagen; preparasi bahan baku, pre-treatment dengan NaOH, hidrolisis dengan asam, dan ekstraksi menggunakan akuades pada suhu 40°C. 2) Karakterisasi kolagen; uji rendemen, uji proksimat, uji pH. 3) Pembuatan nano-partikel kolagen dan karakterisasi ukuran partikel berdasarkan hasil ekstraksi kolagen perlakuan terbaik.

Preparasi kulit tuna sirip kuning

Kulit ikan tuna ekor kuning yang digunakan berasal dari UKM Kirana Kota Gorontalo. Kulit dibersihkan dari sisik, daging, serta kotoran yang masih tersisa kemudian dicuci hingga bersih. Selanjutnya kulit dipotong dengan ukuran 0,5x0,5 cm. Bahan baku kulit ikan tuna kemudian ditimbang bobotnya menggunakan timbangan digital dan disimpan pada suhu *freezing* sampai kulit digunakan.

Pretreatment dengan NaOH

Pretreatment mengacu pada metode Wulandari (2016) dengan modifikasi. Proses pretreatment kulit ikan tuna dengan NaOH bertujuan untuk mengeliminasi protein non-kolagen, lemak, mineral, pigmen dan odor (*degreasing*). Sampel kulit ikan beku terlebih dahulu dilelehkan dengan air mengalir sebelum digunakan. Kulit ikan yang telah dipreparasi sebelumnya direndam dalam larutan NaOH 0,05 M selama 6 jam dengan rasio antara kulit dan larutan NaOH adalah 1:10 (b/v). Larutan alkali diganti sebanyak 3 (tiga) kali pada selang waktu 2 (dua) jam. Selanjutnya kulit ikan hasil perendaman dinetralisasi dengan akuades hingga pH netral.

Hidrolisis dalam larutan asam asetat

Hidrolisis dalam larutan asam asetat dilakukan berdasarkan metode Wulandari (2016) dengan modifikasi. Sampel yang telah melalui proses pretreatment selanjutnya dihidrolisis menggunakan metode ASC (*Acid Soluble Collagen*) melalui perendaman sampel dalam larutan asam asetat (CH₃COOH). Hidrolisis dengan larutan asam asetat bertujuan untuk mengubah struktur serat kolagen sehingga mempermudah proses ekstraksi. Kulit ikan direndam dalam asam asetat 0,1 M selama 2 jam. Adapun perbandingan antara sampel dengan asam asetat adalah 1:10 (b/v). Kemudian sampel hasil hidrolisis dinetralkan menggunakan akuades hingga mencapai pH netral.

Hidro-ekstraksi

Hidro-ekstraksi kolagen mengacu pada metode Kolanus *et al.*, (2019) dengan modifikasi. Kulit ikan hasil hidrolisis asam yang telah dinetralkan kemudian diekstraksi dengan metode hidro-ekstraksi menggunakan akuades dengan perbandingan akuades dan sampel yakni 1:2 (b/v) pada suhu *waterbath* 40°C. Proses hidro-ekstraksi dilakukan dengan 3 variasi perlakuan lama waktu ekstraksi yaitu 1, 3 dan 5 jam.

Hasil ekstraksi ini disaring dengan dua lapis kain tipis untuk mendapatkan filtrat. Filtrat hasil ekstraksi kemudian disentrifuse selama 30 menit pada kecepatan 6000 rpm. Selanjutnya hasil sentrifugasi dikeringkan menggunakan oven pada suhu 40°C selama 2x24 jam, untuk mendapatkan kolagen kering. Untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan dilakukan pengamatan berupa uji fisik dan kimia yang meliputi rendemen, proksimat dan pH dengan sampel yang sebelumnya telah dikeringkan.

Pembuatan nano-kolagen

Pembuatan nano-kolagen dilakukan berdasarkan metode Alhana (2015). Pembuatan kolagen nano-partikel didasarkan dari hasil perlakuan terbaik pada ekstraksi kolagen yang telah dihasilkan sebelumnya. Larutan kolagen hasil hidro-ekstraksi selanjutnya diproses lebih lanjut untuk membentuk partikel berukuran kecil (*sizing*) yaitu dalam bentuk nano-partikel. Proses pembuatan nanokolagen melalui *sizing* menggunakan *magnetic stirrer* berkecepatan tinggi (1.500 rpm) pada suhu 35–40°C selama 3 jam. Presipitasi speris dengan cara ditambahkan etanol 96% sedikit demi sedikit dalam kondisi masih di-*stirring*. Pada tahap ini digunakan rasio larutan kolagen terhadap etanol 96% 1:1 (v/v). Selanjutnya nano-kolagen yang dihasilkan dievaporasi pada suhu 30°C dan kemudian dilakukan analisis ukuran partikel nano-kolagen menggunakan mikroskop cahaya.

Analisis rendemen kolagen

Analisis nilai rendemen kolagen dilakukan berdasarkan metode Shyni *et al.*, (2014), Rendemen kolagen diperoleh dari perbandingan berat kering kolagen yang dihasilkan dengan berat bahan kulit (yang telah dibersihkan dari sisa daging, sisik dan kotoran lainnya). Rendemen diperoleh dengan rumus:

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

Analisis proksimat kolagen

Analisis kadar protein, kadar air dan kadar lemak kolagen ditentukan menggunakan metode BSN (2006).

Analisis pH kolagen

Analisis pH dilakukan dengan menggunakan pH meter digital mengacu pada metode AOAC (2005). Sampel sebanyak 1 g sampel dilarutkan dalam 20 ml akuades, kemudian ditambahkan 50 ml akuades dan dihomogenkan. Alat pH meter dinyalakan dan dibiarkan hingga stabil terlebih dahulu, kemudian elektroda dicelupkan ke dalam sampel hingga beberapa saat sampai diperoleh angka yang stabil pada proyektor pH meter.

Analisis ukuran mikroskopis nano-kolagen

Ukuran partikel nano-kolagen dilakukan berdasarkan metode Mahardika (2013). Sampel diambil secara acak sebanyak 1 mL, kemudian ditetaskan pada lensa identifikasi kemudian diamati dengan pembesaran 40x10 yang akan secara otomatis terekam pada layar monitor yang selanjutnya

akan menampilkan sejumlah data dan informasi dari ukuran dan penampakan dari nano-partikel yang dihasilkan. Pengamatan ukuran mikroskopis partikel nano-kolagen dilakukan dengan 2 kali ulangan. Penentuan ukuran partikel dilakukan dengan melihat interval ukuran partikel terkecil hingga ukuran partikel terbesar yang berhasil diamati. Data hasil pengukuran partikel nano-kolagen akan diolah dan disajikan secara deskriptif kuantitatif, serta diinterpretasikan sebagai hasil yang valid.

Analisis data

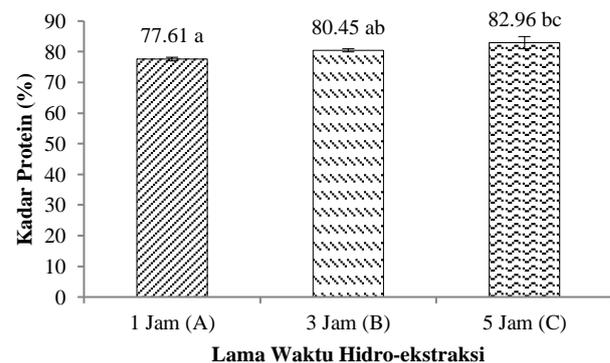
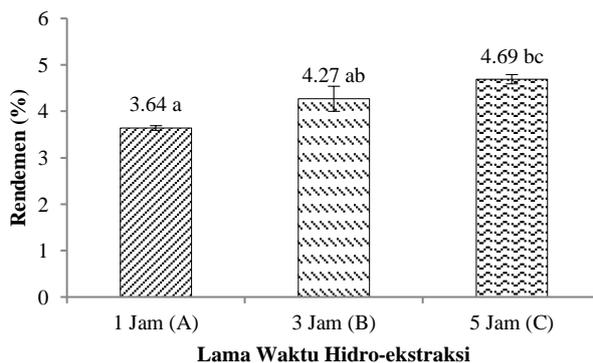
Penelitian dirancang dengan menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap. Faktor perlakuan adalah lama waktu hidro-ekstraksi yang terdiri dari 3 level yaitu, 1 jam (A), 3 jam (A) dan 5 jam (A), masing-masing perlakuan diulang sebanyak 2 kali. Parameter pengujian yang diamati adalah rendemen kolagen, nilai proksimat dan pH.

Data hasil pengujian yang diperoleh dianalisis menggunakan analisis keragaman. Apabila hasil yang diperoleh menunjukkan adanya pengaruh yang berbeda nyata pada taraf signifikansi $p < 0,05$ terhadap parameter uji, maka hasil yang berbeda nyata tersebut dilakukan uji lanjut Duncan. Uji lanjut Duncan dilakukan untuk mengetahui perlakuan mana saja yang memberikan pengaruh yang berbeda nyata terhadap parameter yang dianalisis.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Rendemen kolagen

Rendemen menunjukkan bagian bahan baku yang dapat dimanfaatkan dan menjadi suatu parameter yang penting untuk mengetahui nilai ekonomis, serta keefektifan suatu bahan atau produk. Histogram nilai rendemen kolagen pada lama waktu hidro-ekstraksi berbeda dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Rendemen Kolagen Pada Lama Waktu Hidro-ekstraksi Berbeda.

Gambar 2. Kadar Protein Kolagen Pada Lama Waktu Hidro-ekstraksi Berbeda.

Ket.: Notasi huruf yang berbeda menunjukkan terdapat perbedaan yang nyata ($p > 0,05$) berdasarkan uji lanjut Duncan.

Berdasarkan hasil analisis statistik ANOVA diketahui bahwa perlakuan lama waktu hidro-ekstraksi berpengaruh nyata ($p < 0,05$) terhadap nilai rendemen kolagen kulit ikan tuna. Hasil uji lanjut Duncan menunjukkan terdapat perbedaan nyata antara perlakuan A dengan perlakuan C, namun perlakuan A dan perlakuan B, serta perlakuan B dan perlakuan C tidak berbeda nyata. Persentase nilai rendemen kolagen kulit ikan tuna tertinggi terdapat pada perlakuan C dengan jumlah rendemen kolagen 4,69%, sedangkan nilai rendemen terendah diperoleh pada perlakuan A dengan nilai 3,64%.

Waktu ekstraksi dapat mempengaruhi jumlah rendemen kolagen yang dihasilkan, hal ini diduga disebabkan oleh peningkatan waktu hidro-ekstraksi memungkinkan semakin banyaknya air yang berpenetrasi ke dalam jaringan kulit ikan yang pada akhirnya memudahkan larutnya kolagen. Hasil yang didapat pada penelitian ini sejalan dengan hasil penelitian Shon, *et al.*, (2011), yang melaporkan bahwa terjadi peningkatan jumlah rendemen kolagen kulit ikan Skate seiring dengan meningkatnya waktu ekstraksi. Hal ini juga sesuai dengan pernyataan Wang, *et al.*, (2008), yang menyatakan bahwa proses ekstraksi dapat dipengaruhi oleh waktu ekstraksi karena perpindahan molekul suatu zat selama proses difusi tergantung pada waktu.

Persentase rendemen yang diperoleh pada penelitian ini lebih tinggi dibandingkan hasil penelitian Kolanus *et al.*, (2019), menggunakan bahan baku kulit ikan tuna dengan kombinasi metode hidro-ekstraksi selama 1 jam dengan perendaman asam asetat 0,05 dan 0,1 M berturut-turut 1,95% dan 2,57%. Penggunaan metode hidro-ekstraksi yang dilakukan Wulandari (2016), pada ekstraksi kolagen dari kulit ikan gabus (*Channa striata*) memperoleh rendemen lebih tinggi yaitu 16,00%.

Kadar protein kolagen

Protein merupakan sumber asam amino yang mengandung unsur C, H, O dan N yang tidak dimiliki oleh lemak dan karbohidrat. Protein adalah polipeptida yang berat molekulnya lebih dari 5000 makromolekul dan memiliki sifat fisik yang berbeda-beda (Ngili, 2013). Histogram kadar protein pada lama waktu hidro-ekstraksi berbeda dapat dilihat pada Gambar 2.

Berdasarkan hasil perhitungan statistik ANOVA yang dilakukan diketahui bahwa lama waktu hidro-ekstraksi berpengaruh nyata ($p < 0,05$) terhadap kadar protein kolagen kulit ikan tuna sirip kuning pada penelitian ini. Hasil uji lanjut Duncan menunjukkan bahwa perlakuan A berbeda nyata dengan perlakuan C, namun tidak terdapat perbedaan nyata antara perlakuan A dan B, serta perlakuan B dan C. Kadar protein tertinggi diperoleh pada perlakuan C dengan total protein sebesar 82,96%, sedangkan kadar protein terendah diperoleh pada perlakuan A yaitu 77,61%.

Kadar protein kolagen kulit ikan tuna sirip kuning pada penelitian ini berbanding lurus dengan jumlah rendemen kolagen yang dihasilkan, karena protein merupakan komposisi proksimat dominan yang terdapat pada kolagen. Kadar protein dan rendemen kolagen kulit ikan tuna meningkat seiring dengan lamanya waktu hidro-ekstraksi. Menurut Devi, *et al.*, (2017), kolagen merupakan penyusun 80% total protein yang terdapat pada kulit ikan. Kolagen merupakan produk turunan dari protein, kolagen merupakan protein jaringan ikat. Protein jaringan ikat merupakan protein yang lebih sulit diekstrak apabila dibandingkan dengan protein lain oleh karena itu optimasi proses ekstraksi akan sangat menentukan tingkat kelarutan protein kolagen.

Persentase kandungan protein pada penelitian ini lebih tinggi apabila dibandingkan dengan kolagen kulit ikan patin yaitu 64,74% (Suptidjah, *et al.*, 2018)). Namun lebih rendah dibandingkan kolagen kulit ikan gabus (96,21%) (Wulandari, 2016), kolagen kulit ikan pari (86,97%) (Nur'aenah, 2013). Kadar protein kolagen kulit ikan tuna sirip kuning pada seluruh perlakuan dalam penelitian ini telah memenuhi standar kolagen yang ditetapkan BSN (2014) tentang syarat mutu dan pengolahan kolagen kasar dari sisik ikan yaitu $>75\%$.

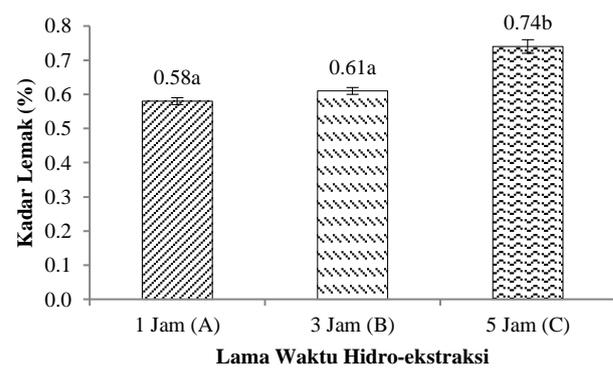
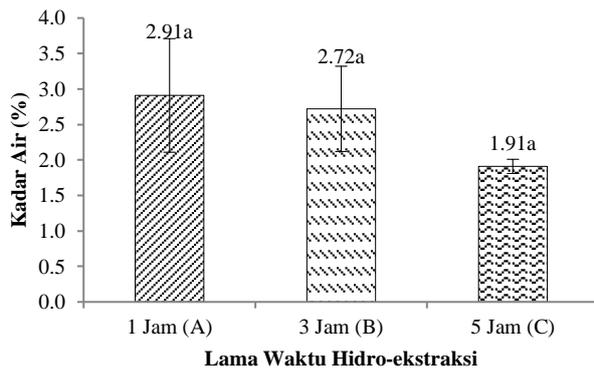
Rangkaian ekstraksi kolagen kulit ikan tuna ekor kuning yang diawali dengan pre-treatment NaOH, perendaman dengan asam asetat dan dilanjutkan dengan hidro-ekstraksi memiliki peranan dalam menentukan kandungan protein kolagen. NaOH berperan dalam pemisahan untaian dari batang-batang serat kolagen. Yoshimura, *et al.*, (2000) melaporkan bahwa basa menyerang terutama wilayah teleopeptida dari struktur kolagen selama proses pretreatment, sehingga dapat menyebabkan kelarutan kolagen.

Perendaman dalam asam menyebabkan terjadinya pengembangan kulit (*swelling*) yang diakibatkan masuknya air ke dalam serat kolagen. Masuknya air ke dalam serat kolagen disebabkan terjadinya gaya elektrostatis antara gugus polar pada serat kolagen dengan H^+ dari asam, atau terbentuknya ikatan hidrogen antara gugus non polar pada serat kolagen dengan H^+ dari asam (Jaswir *et al.*, 2011). Pembengkakan ini penting karena dapat mendukung rusaknya struktur serat kolagen, melalui terganggunya ikatan non kovalen dan pada akhirnya mempermudah ekstraksi dan meningkatkan kelarutan kolagen.

Menurut Prasetyo (2018), protein kolagen mengalami perubahan berupa pembengkakan (*swelling*), karena adanya interaksi antara fibril kolagen dengan larutan asam. Interaksi tersebut ditunjukkan dengan kenaikan persentase bobot kulit ikan setelah perendaman dalam kurun waktu tertentu. Proses pemanasan kulit dalam air hangat (Hidro-ekstraksi) dapat menyebabkan berlanjutnya kerusakan hidrogen dan kovalen yang sebelumnya sudah berlangsung selama proses perendaman asam asetat (Suptidjah *et al.*, 2018).

Kadar air kolagen

Kadar air dalam suatu bahan terdiri atas air bebas dan air terikat secara kimia, dan kadar air yang terukur merupakan air bebas dalam bahan baku. Histogram kadar air kolagen pada lama waktu hidro-ekstraksi berbeda dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Kadar Air Kolagen Pada Lama Waktu Hidro-ekstraksi Berbeda. **Gambar 4. Kadar Lemak Kolagen Pada Lama Waktu Hidro-ekstraksi Berbeda.**

Ket.: Notasi huruf yang berbeda menunjukkan terdapat perbedaan yang nyata ($p > 0,05$) berdasarkan uji lanjut *Duncan*.

Berdasarkan uji statistik ANOVA menunjukkan bahwa perlakuan lama waktu hidro-ekstraksi tidak berpengaruh nyata ($p > 0,05$) terhadap persentase kadar air dalam kolagen kulit ikan tuna sirip kuning. Hal ini diduga dikarenakan semua perlakuan dikeringkan dengan menggunakan oven pada suhu dan waktu pengeringan yang sama. Sejalan dengan penelitian Alhana (2015), yang melaporkan bahwa tidak terdapat pengaruh perlakuan terhadap kadar air dalam kolagen daging teripang gamma (*S. variegatus*) karena semua perlakuan kolagen dikeringkan menggunakan metode yang sama secara bersamaan.

Persentase kadar air pada kolagen kulit ikan tuna sirip kuning yang dihasilkan masih dalam rentang angka yang diperbolehkan oleh Standar Nasional Indonesia (SNI) untuk kolagen yaitu tidak melebihi 12% (BSN, 2014). Persentase kadar air kolagen yang diperoleh pada perlakuan A yaitu 2,91%, perlakuan B 2,71% dan kadar air pada perlakuan C yaitu 1,91%. Kadar air kolagen kulit ikan tuna sirip kuning pada penelitian ini lebih rendah bila dibandingkan dengan kandungan air kolagen kulit ikan patin yaitu 6,55% (Suptidjah, *et al.*, 2018), kolagen kulit ikan kakap putih 17,8% (Hardiyanti, 2017). Rendahnya kadar air kolagen pada penelitian ini diduga dikarenakan dalam proses pengeringan dilakukan menggunakan oven pada suhu 40°C. Menurut Rahmawati (2020), kadar air dalam kolagen akan mudah menguap pada saat pengeringan dalam oven. Hal ini didukung oleh pernyataan Winarno (1995) bahwa semakin tinggi suhu pengeringan maka semakin cepat terjadi penguapan, sehingga kandungan air dalam bahan semakin rendah.

Kandungan air ikut menentukan kesegaran dan daya tahan suatu bahan (Gadi, *et al.*, 2017). Kadar air di dalam kolagen akan berpengaruh terhadap daya simpan, karena kadar air erat kaitannya dengan aktivitas metabolisme yang terjadi selama kolagen tersebut disimpan seperti aktivitas enzim, aktivitas mikroba dan aktivitas kimiawi sehingga menimbulkan perubahan sifat-sifat organoleptik dan nilai mutunya. Semakin tinggi kadar air di dalam kolagen maka lama umur kolagen semakin rendah namun sebaliknya apabila kadar air rendah maka umur simpan kolagen semakin lama (Noorman, 2016).

Kadar lemak kolagen

Lemak adalah salah satu komponen utama yang terdapat dalam kulit ikan selain protein dan air, oleh karena itu peranan lemak dalam menentukan karakteristik suatu bahan cukup besar. Histogram kadar lemak kolagen pada lama waktu ekstraksi berbeda dapat dilihat pada Gambar 4.

Hasil analisis statistik ANOVA menunjukkan bahwa lama waktu hidro-ekstraksi berpengaruh nyata ($p < 0,05$) terhadap kadar lemak yang terkandung dalam kolagen kulit ikan tuna sirip kuning. Berdasarkan hasil uji lanjut *Duncan* diketahui bahwa perlakuan A dan perlakuan B berbeda nyata dengan perlakuan C, namun tidak terdapat perbedaan yang nyata antara perlakuan A dan perlakuan B. Kadar lemak kolagen kulit ikan tuna sirip kuning terendah diperoleh dari perlakuan A yaitu 0,58% dan kadar lemak tertinggi diperoleh dari perlakuan C yaitu 0,74%.

Kadar lemak kolagen mengalami peningkatan seiring meningkatnya waktu hidro-ekstraksi. Peningkatan kadar lemak berkorelasi dengan peningkatan kadar protein pada kolagen hasil hidro-ekstraksi. Hal ini diduga disebabkan oleh lemak yang terikat dalam protein (lipoprotein) ikut

terlarut pada saat proses ekstraksi dan terdeposisi diantara protein-protein kolagen. Kartika, *et al.*, (2016), menyatakan bahwa proses denaturasi simultan dengan senyawa asam dan suhu tinggi mengakibatkan lipoprotein terpisah dari jaringan dan terlarut ke larutan ekstraktor. Hal ini juga didukung hasil penelitian Said *et al.*, (2011), yang melaporkan terjadi peningkatan kadar lemak seiring dengan meningkatnya lama waktu *curing* yang disebabkan oleh semakin banyaknya molekul protein terikat lemak (lipoprotein) yang terlarut diantara protein kolagen saat dilakukan proses *curing*.

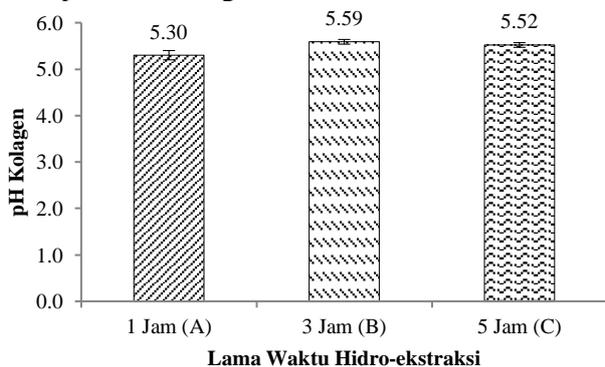
Secara keseluruhan kadar lemak pada penelitian ini lebih rendah apabila dibandingkan dengan kadar lemak kolagen kulit ikan patin hasil penelitian Devi *et al.*, (2017), dengan metode hidro-ekstraksi yaitu 2,13%, namun lebih tinggi bila dibandingkan dengan kadar lemak kolagen (ASC) kulit ikan hiu yaitu 0,37% (Hema *et al.*, 2013). Penelitian Kartika *et al.*, (2016), melaporkan bahwa kadar lemak yang berhasil diekstrak dengan asam lebih tinggi, apabila dibandingkan dengan proses hidro-ekstraksi.

Kadar lemak kolagen kulit ikan tuna sirip kuning pada seluruh perlakuan telah memenuhi standar kadar lemak kolagen BSN (2014), yaitu maks 1%. Rendahnya kandungan lemak kolagen kulit ikan tuna ini mengindikasikan keberhasilan proses pretreatment kulit menggunakan larutan NaOH 0,05 M (b/v) selama 6 jam untuk menghilangkan lemak dalam kulit ikan, sehingga dapat meningkatkan kualitas kolagen yang dihasilkan. Liu *et al.*, (2014), menyatakan bahwa efisiensi *pretreatment* dalam larutan NaOH dipengaruhi oleh waktu, suhu, konsentrasi NaOH dan bahan baku yang digunakan. Menurut Zhou dan Regenstein (2005), penggunaan larutan alkali pada proses *pretreatment* selain dapat menghilangkan protein non-kolagen juga dapat menghilangkan keberadaan lemak, pigmen serta mineral yang terikat pada protein.

pH kolagen

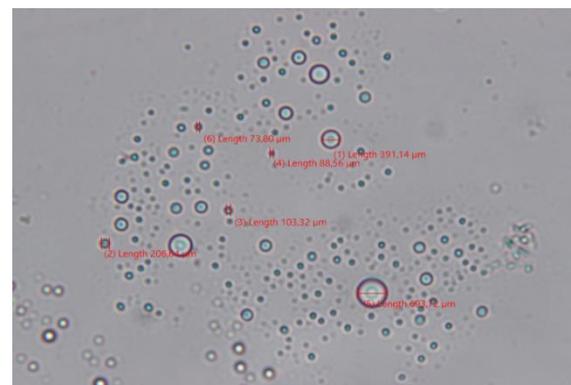
Uji kadar keasaman (pH) pada kolagen bertujuan untuk mengetahui tingkat keasaman atau kebasaan kolagen. Nilai pH merupakan salah satu parameter untuk memenuhi standar mutu kolagen dengan standar kolagen yang ditetapkan oleh Badan Standarisasi Nasional (BSN). Histogram nilai pH kolagen pada lama waktu hidro-ekstraksi berbeda dapat dilihat pada Gambar 5.

Hasil analisis statistik ANOVA menunjukkan bahwa perlakuan lama waktu hidro-ekstraksi tidak berpengaruh nyata ($p > 0,05$) terhadap nilai pH kolagen. Berdasarkan histogram pada Gambar 5 diketahui bahwa, nilai pH kolagen pada masing-masing perlakuan yaitu perlakuan A 5,30, perlakuan B 5,69 dan pada perlakuan C yaitu 5,52. Nilai pH kolagen kulit ikan tuna sirip kuning pada penelitian ini secara keseluruhan lebih rendah apabila dibandingkan dengan syarat pH kolagen yang ditetapkan Badan Standarisasi Nasional (BSN, 2014) yaitu berkisar antara 6,5 sampai 8. Nilai pH kolagen pada penelitian ini tergolong rendah atau cenderung asam, rendahnya nilai pH diduga dipengaruhi oleh proses penetralan yang dilakukan tidak sempurna sehingga menyebabkan nilai pH cenderung asam.



Gambar 5. Nilai pH Kolagen Pada Lama Waktu Hidro-ekstraksi Berbeda.

Ket.: Notasi huruf yang berbeda menunjukkan terdapat perbedaan yang nyata ($p > 0,05$) berdasarkan uji lanjut Duncan.



Gambar 6. Ukuran Mikroskopis Nanokolagen.

Nilai pH kolagen yang diperoleh lebih tinggi bila dibandingkan ASC dan PSC dari kulit ikan baramundi yaitu 3,41 dan 3,44 (Jamilah *et al.*, 2013) dan pH kolagen beberapa merk kolagen untuk kosmetik yaitu berkisar antara 3,8–4,7 (Peng *et al.*, 2004). Menurut Mahardika (2013), penetralan yang dilakukan secara berulang-ulang akan mempengaruhi hasil akhir dari nilai pH yang dihasilkan, sebab penetralan mampu mengurangi kadar asam-basa suatu larutan setelah perendaman.

Penggunaan metode hidro-ekstraksi pada ekstraksi kolagen dapat memberikan nilai pH akhir kolagen yang mendekati netral, dibandingkan metode ASC dan PSC. Hal ini dikarenakan metode hidro-ekstraksi menggunakan konsentrasi asam yang lebih rendah, kemudian dilakukan netralisasi dan ekstraksi menggunakan air sehingga nilai pH kolagen cenderung netral (Safithri *et al.*, 2019). Hal ini didukung oleh hasil penelitian Kurniawan (2016), yang melaporkan bahwa nilai pH kolagen kulit ikan parang-parang yang diisolasi dengan metode hidro-ekstraksi 6,55.

Ukuran mikroskopis nano-kolagen

Pembuatan nano-kolagen kulit ikan tuna sirip kuning dilakukan pada kolagen perlakuan terbaik yang dihasilkan berdasarkan karakteristik fisik yaitu nilai rendemen dan karakteristik kimia yang meliputi nilai kadar protein, air, lemak dan pH kolagen. Kolagen kulit ikan tuna terbaik didapat dari perlakuan lama waktu hidro-ekstraksi 5 jam dengan nilai rendemen 4,69%, protein 82,96%, air 1,91%, lemak 0,74% dan nilai pH 5,52. Hasil pengujian ukuran partikel yang dilakukan menggunakan mikroskop binokuler pada pembesaran 40x10 diketahui bahwa ukuran partikel nano-kolagen terkecil yang berhasil diamati adalah 73,80 nm hingga ukuran terbesar yaitu 693,72 nm. Hasil ini sesuai dengan referensi yang diperoleh menyatakan bahwa nano-partikel didefinisikan sebagai partikel yang terisolasi yang memiliki ukuran sekitar 10–1000 nm (Mohanraj dan Chen, 2006). Namun kolagen nano-partikel yang dihasilkan pada penelitian ini relatif lebih besar dibandingkan dengan definisi nano-partikel menurut Bolzinger *et al.*, (2011), yang mendefinisikan nano-partikel memiliki ukuran antara 1–100 nm. Kenampakan visual dari nano-kolagen yang dihasilkan dapat dilihat pada Gambar 6.

Penambahan etanol menyebabkan berkurangnya jumlah air yang dapat diikat oleh molekul kolagen dan sebaliknya meningkatkan reaksi hidrofobik dengan terbentuknya ikatan hidrogen intra-molekul kolagen. Hal ini menyebabkan perubahan struktur kolagen menjadi bentuk terdehidrasi. Nano-kolagen yang dihasilkan dari kulit ikan tuna sirip kuning memiliki potensi untuk dapat diaplikasikan sebagai bahan baku kosmetik terutama untuk diaplikasikan pada kulit. Hal ini sesuai pernyataan Ganesh *et al.*, (2012), bahwa ukuran pori-pori tubuh manusia memiliki diameter antara 200–500 nm, dengan demikian nano-partikel kolagen yang dihasilkan akan mampu terserap dan terdifusi dengan baik pada permukaan kulit. Hal tersebut juga oleh (Kumar *et al.*, 2011) yang menyatakan bahwa kolagen yang terbuat dari kulit dan tulang ikan memiliki struktur molekul yang lebih kecil dibandingkan kolagen yang terbuat dari sapi atau babi sehingga lebih mudah untuk diserap.

Hasil penelitian Komala *et al.*, (2014), melaporkan bahwa nano-partikel kolagen dari kulit ikan mas dengan rata-rata ukuran partikel 388,53 nm mampu meningkatkan kecerahan kulit pada area yang memiliki bekas luka. Pengujian secara *in vivo* telah dilakukan oleh Kumar *et al.*, (2011) yang menunjukkan bahwa kolagen yang diekstraksi dari sisik ikan Tilapia (*Oreochromis niloticus*) mampu mengurangi kerutan di bagian dahi setelah 25 hari pemakaian. Hal ini disebabkan ukuran molekul yang kecil sehingga mudah menembus jaringan epidermis dan dermis sehingga mampu memperbaiki sel kulit yang rusak.

KESIMPULAN

Kolagen kulit ikan tuna terbaik didapat dari perlakuan lama waktu hidro-ekstraksi 5 jam dengan nilai rendemen 4,69%, protein 82,96%, air 1,91%, lemak 0,74% dan nilai pH 5,52. Karakteristik kimia kolagen perlakuan terbaik telah memenuhi SNI kolagen yang ditetapkan oleh BSN (2014). *Sizing* nano-kolagen pada suhu 35–40°C selama 3 jam menghasilkan nano-kolagen dengan interval ukuran 73,80 nm sampai 693, 72 nm dan telah memenuhi kriteria nano-partikel yaitu 10–1000 nm.

DAFTAR PUSTAKA

- [AOAC] Association of Official Analytical Chemist. 2005. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Virginia (US): Association of Official Analytical Chemist Inc. Arlington.
- [BSN] Badan Standarisasi Nasional. 2006. SNI 01.2354.2-2006. Cara Uji Kimia-Bagian 2: Penentuan Kadar Air Pada Produk Perikanan. Jakarta: Badan Standarisasi Nasional.
- [BSN] Badan Standarisasi Nasional. 2006. SNI 01.2354.3-2006. Cara Uji Kimia-Bagian 3: Penentuan Kadar Lemak Total Pada Produk Perikanan. Jakarta: Badan Standarisasi Nasional.
- [BSN] Badan Standarisasi Nasional. 2006. SNI 01.2354.4-2006. Cara Uji Kimia-Bagian 4: Penentuan Kadar Protein Pada Produk Perikanan. Jakarta: Badan Standarisasi Nasional.
- [BSN] Badan Standarisasi Nasional. 2014. SNI 8076:2014. Kolagen Kasar dari Sisik Ikan-Syarat Mutu dan Pengolahan. Jakarta: Badan Standarisasi Nasional.
- Alhana. 2015. Ekstraksi dan Karakterisasi Kolagen Dari Daging Teripang Gamma (*Stichopus variegatus*). TESIS. Sekolah Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Bolzinger MA, Briancon S, Chevalier Y. 2011. Nano-particles Trough The Skin. Managing Conflicting Results of Inorganic and Organic Particles in Cosmetics and Pharmaceuticals. *Adv Rev* 3: 463–478.
- Chen, J., Li, L., Yi, R., Xu, N., Gao, R., & Hong, B. (2016). Extraction and Characterization of Acid-Soluble Collagen From Scales and Skin of Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *LWT-Food Science and Technology*, 66, 453–459.
- Devi, HLNA., P. Suptijah, dan M. Nurilmala. 2017. Efektifitas Alkali dan Asam terhadap Mutu Kolagen dari Kulit Ikan Patin. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 20 (2): 255–265.
- Fawzya 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.
- Gadi, D.S., W. Trilaksani, dan T. Nurhayati, 2017. Histologi, Ekstraksi Dan Karakterisasi Kolagen Gelembung Renang Ikan Cunang. *Kelautan Tropis*. 9(2): 665–683.
- Ganesh Sharma N, Sanadya J, Kaushik A, Dwivedi A. 2012. Penetration Enhancement of Medicinal Agents. *International Research Journal of Pharmacy* 3(5): 2230–8407.
- 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* 16:25–34.
- Hema GS, Shyni K, Mathew S, Anandan R, Ninan G. 2013. A Simple Method for Isolation of Fish Skin Collagen-Biochemical Characterization of Skin Collagen Extracted from Albacore Tuna (*Thunnus alalunga*), Dog Shark (*Scoliodon Sorrakowah*), and Rohu (Labeo Rohita). 2013. *Annals of Biol Res*. 4(1): 271–278.
- Huang CY, Kuo JM, Wu SJ, Tsai HT. 2016. Isolation and Characterization of Fish Scale Collagen From Tilapia (*Oreochromis sp.*) by A Novel Extrusion-hydro Extraction Process. *Food Chemistry*. 190:997–1006.
- Jamilah B, Hartina U, Hashim M, Sazili AQ. 2013. Properties of Collagen From Barramundi (*Lutes calcarifer*) Skin. *International Food Research Journal*. Vol. 20 (2): 835–842.
- 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.
- Kartika, I.W., W. Trilaksani, dan I Ketut M. Adnyane. 2016. Karakterisasi Kolagen Dari Limbah Gelembung Renang Ikan Cunang Hasil Ekstraksi Asam dan Hidrotermal. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 19(3): 222–232
- Kolanus JPM, Hdinoto S, Idrus S. 2019. Karakteristik Kolagen Larut Asam Dari Kulit Ikan Tuna (*Thunnus albacores*) Dengan Metode Hidro-ekstraksi. *Jurnal Riset Teknologi Industri*. Vol 13 (1): 99–110.
- Kolodziejka I, Skierka E, Sadowska M, Kolodziejki W, Niecikowska C. 2008. Effect of Extracting Time and Temperature on Yield of Gelatin from Different Fish Offal. *Food Chemistry*. 107: 700–706.
- Komala AH. 2015. Ekstraksi dan Karakterisasi Kolagen Dari Kulit Ikan Tongkol (*Euthynnus affinis*). [Skripsi]. Bogor (ID): Departemen Teknologi Hasil Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor.
- Komala HK, Widowati SC, Aleida CS, Saogo KM, Damayanti R. 2014. Inovasi Nano Kolagen Dari Limbah Sisik Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) Untuk Mempercepat Proses Penghilangan Bekas Luka Pada Kulit Secara *In Vivo*. [Laporan Akhir Program Kreativitas Mahasiswa Penelitian]. Insitut Pertanian Bogor. Bogor.
- 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.
- Liu D, Wei G, Li T, Hua J, Lu J, Regenstien JM, Zhou P. 2014. Effects of Alkaline Pretreatments and Acid Extraction Conditions on the Acid-Soluble Collagen from Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella*) Skin. *Food Chemistry*. 172:836–843.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.147.
- Mahardika S. 2013. Isolasi dan Karakterisasi Kolagen Nano-Partikel Dari Kulit Ikan Cucut Bambu (*Chiloscyllium punctatum*) [skripsi]. Bogor (ID): Departemen Teknologi Hasil Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor.
- Mayasari, 2016. Ekstraksi Kolagen Optimum Dari Kulit Ikan Tuna (Antioksidan). [Skripsi]. Departemen Kimia. Fakultas MIPA-IPB.

- Mohanraj VJ and Y Chen. 2006. Nanoparticles-A Review. Tropical journal of pharmaceutical research. 5(1): 561–573.
- Ngili, Y. 2013. Protein dan Enzim. Rekayasa Sains. Bandung.
- Noorman, T. A. (2016). Perbandingan Produksi Kolagen Dari Sisik dan Tulang Ikan Gurami (*Osphronemus gouramy*) Secara Kimia dan Enzimatis. Artikel Ilmiah, 15:9–10.
- Peng, Y., Glattauer, V., Werkmeister, J.A., & Ramshaw, J.A.M. (2004). Evaluation for Collagen Products for Cosmetic Application. J Cosmestic Sci. 55, 327–341.
- Prasetyo NB. 2018. Isolasi dan Karakterisasi Fisikomia Kolagen Dari Ceker Ayam Dengan Metode Hidro-Ekstraksi. Bogor (ID): Departemen Teknologi Industri Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor.
- Pringgandini LA, Indarti GY, Melinda, Sari M. 2018. Efektifitas Spray Nano-kolagen Limbah Sisik Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) Untuk Mempercepat Proses Penyembuhan Luka Insisi. J Ked Gi Unpad. Vol 30(2):114–120.
- Rahmawati D. 2020. Pengaruh Variasi Jenis Asam Terhadap Produksi Kolagen Berbahan Dasar Tulang Ikan Tongkol (*Euthynus affinis*). [Skripsi]. Jurusan Kimia. Fakultas Sais dan Teknologi. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim. Malang.
- Safithri M, Tarman K, Suptijah P, Widowati N. 2019. Karakteristik Fisikokimia Kolagen Larut Asam Dari Kulit Ikan Parang-Parang (*Chirocentrus dorab*). JPHPI. Vol 22 (3): 441–452.
- Said M.I, Likadja J.C. Hatta M. 2011. Pengaruh Waktu dan Konsentrasi Bahan Curing Terhadap Kuantitas dan Kualitas Gelatin Kulit Kambing Yang di Produksi Melalui Proses Asam. JITP. Vol 1 (2): 119–128.
- Schrieber, R. and Garies, H., 2007. Gelatin Handbook: Theory dan Industrial Practice. Weineim (DE): WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Shon J, Ji-Hyun E, Hwang SJ, Jong-Bang E. 2011. Effect of Processing Conditions on Functional Properties Of Collagen Powder from Skate (*Raja kenoeji*) Skins. Food Science Biotechnology. 20(1): 99–106.
- Shyni K, Hema GS, Ninan G, Mathew S, Joshy CG, Lakshmanan PT. 2014. Isolation and Characterization of Gelatin from The Skins of Skipjack Tuna (*Katsuwonus pelamis*), Dog Shark (*Scoliodon sorrakowah*) and Rohu (*Labeo rohita*). Food Hydrocolloids. 39: 68–76. doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.12.
- Soedirga LC, Matita IC, Wijaya TE. 2020. Karakteristik Fisikokimia Tepung Kembang Kol Hasil Pengeringan Dengan Pengering Kabinet dan Oven. Jurnal Sains dan Teknologi. Vol. 2(2): 57–68.
- Suptijah P, Indriani D, Wardoyo SE. 2018. Isolasi dan Karakterisasi Kolagen Kulit Ikan Patin (*Pangasius sp.*). Jurnal Sains Natural Nusa Bangsa. Vol 8 (1): 8–23.
- Wang, L., An, X. X., Yang, F. M., Xin, Z. H., Zhao, L. Y., & Hu, Q. H. 2008. Isolation and Characterisation of Collagens from The Skin, Scale and Bone of Deep-Sea Redfish (*Sebastes mentella*). Food Chemistry. 108, 616–623.
- Winarno FG. 1995. Kimia Pangan dan Gizi. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Wulandari. 2016. Karakterisasi Fisikomia Kolagen yang Diisolasi Dengan Metode Hidro-Ekstraksi dan Stabilitas Nano-kolagen Kulit Ikan Gabus (*Channa striata*). [Tesis]. Sekolah Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Yoshimura K, Terashima M, Hozan D, Shirai K. 2000. Preparation and Dynamic Viscoelasticity Characterization of Alkali-Solubilized Collagen from Shark Skin. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 48(3): 685–690.
- Zhou, P., & Regenstein, J.M. 2005. Effects of Alkaline and Acid Pretreatments on Alaska Pollock Skin Gelatin Extraction. J Food Sci, 70 (6), C392–C396.